

Die Funktion von Transkriptionsfaktor (II) B und Mechanismus der Transkriptionsinitiation



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Mirijam Elisabeth Zeller

aus Waidhofen an der Ybbs, Österreich

Regensburg, im April 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.04.2010

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Michael Thomm

<u>Prüfungsausschuss:</u>	Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Wirth
	1. Gutachter und Prüfer:	Prof. Dr. M. Thomm
	2. Gutachter und Prüfer:	Prof. Dr. H. Tschochner
	Prüfer:	Prof. Dr. R. Sterner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-III
I) Einleitung	
1. Zusammensetzung und Evolution von <i>multisubunit</i> RNAPs	2
2. Struktur und Regulation von <i>multisubunit</i> RNAPs	6
3. Initiation der Transkription bei Pol II und der archaeellen RNAP	8
4. Transkriptionsfaktor (II)B	10
5. Der Präinitiationskomplex	12
6. Bestimmung des Transkriptionsstarts	14
7. Der Elongationskomplex	16
8. Mechanismus der RNA-Polymerisation	17
9. <i>Proofreading</i>	18
II) Material	
A) Bezugsquellen	
1. Chemikalien	23
2. Säulenchromatographie	24
3. Enzyme und andere Proteine	24
4. Kits	25
5. Stämme	25
6. Sequenzierung	26
B) Plasmide	26
C) Primer für die Proteinmutagenese	28
D) Oligonukleotide für die Promotormutagenese	29
III) Methoden	
A) Klonierung	
1. Transformation von <i>E. coli</i>	31
2. Gelreinigung von Primern	31
3. Sequenzspezifische Mutagenese von Plasmiden	31
4. Sequenzspezifische Mutagenese mittels Fusions-PCR	32
5. Transformation von <i>S. cerevisiae</i> und Herstellung des Hefestammes AM7	32
6. Komplementationsversuche mit <i>S. cerevisiae</i> TFIIB Mutanten	33
7. Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> TFIIB Mutanten	33

B) Proteinmethoden	
1. Expression	34
2. Reinigung rekombinanter <i>P. furiosus</i> RNAP-Untereinheiten	34
3. Rekombinantes TFB von <i>P. furiosus</i>	36
4. Rekombinantes TFS von <i>P. furiosus</i>	36
5. Rekonstitution der RNAP von <i>P. furiosus</i>	36
6. Nuklearer Extrakt von <i>S. cerevisiae</i>	37
7. Rekombinantes TFIIB von <i>S. cerevisiae</i>	38
C) Herstellung von Matrizen	
1. Standard Transkriptionsmatrize	38
2. Vorgeöffnete Matrizen	39
3. Immobilisierte Matrizen (KMnO ₄ -Footprint, EC20)	39
4. Radioaktiv 5' -endmarkierte EMSA-Matrizen	39
5. Cy5-markierte EMSA-Matrizen	40
6. APB-derivatisierbare Matrize T25 für die <i>in vitro</i> Transkription	40
7. Matrizen für den <i>S. cerevisiae</i> PIC-Rekrutierungsassay	41
D) Assays	
1. <i>In vitro</i> Transkription	41
2. Abortive Transkription	41
3. EC20 und Kinetik der TFS induzierten RNA-Spaltung	41
4. Eisenspaltung in EC20 Komplexen	42
5. Transkription an APB-derivatisierten Matrizen	42
6. KMnO ₄ Footprints	42
7. Sequenzierreaktion	43
8. RNA-Spaltung und Elongation an Elongation- <i>Scaffolds</i>	43
9. Band Shift Assay (EMSA)	43
10. <i>S. cerevisiae</i> PIC-Rekrutierungsassay	43
11. <i>In vitro</i> Transkription mit nuklearem Extrakt von <i>S. cerevisiae</i>	44
12. Bestimmung der <i>in vitro</i> Transkriptionsstarts von <i>S. cerevisiae</i>	45

IV) Ergebnisse

A) Mechanismus der Transkriptionsinitiation	
1. Eine neue, zunächst noch unvollständig gelöste Kristallstruktur von Pol-II mit TFIIB aus <i>S. cerevisiae</i>	46
2. Mutanten-Design und bioinformatische Untersuchung archaeeller TFBs	47
3. Erster TFB Mutanten-Satz	49

4. Die fertiggestellte Struktur des Pol II-TFIIB Cokristalls und Design neuer TF(II)B Mutanten	53
5. Zweiter TFB Mutanten-Satz	55
6. Transkription an vorgeöffneten Transkriptionsblasen	59
7. Mutationsanalyse der <i>Clamp Coiled-Coil</i>	64
8. <i>In vivo</i> Analyse von <i>S. cerevisiae</i> TFIIB Mutanten	66
9. Entwicklung des Systems zur <i>in vitro</i> Analyse von Hefe TFIIB	69
10. <i>In vitro</i> Analyse von <i>S. cerevisiae</i> TFIIB Mutanten	71
B) Analyse von Backtracking	
1. Hintergrund der Analyse: Umstrukturierung der RNAP beim Übergang von Initiation zu Elongation	74
2. Der APB-Crosslinker bewirkt keine Arretierung von Elongationskomplexen	75
3. Kinetik der TFS induzierten Spaltung	75
4. Interne RNA-Spaltungsaktivität der RNAP	77
5. Fe ²⁺ -Spaltung von RNA in gestellten Komplexen	78
6. RNA-Elongation und Spaltung an Elongations-Scaffolds	79
V) Diskussion	
A) Mechanismus der Transkriptionsinitiation	
1. Die Rolle des <i>B-readers</i>	80
2. Die Rolle des <i>B-Linkers</i>	84
3. Versuche an vorgeöffneten Matrizen	87
4. Mechanismus der Initiation	88
5. Vergleich von TF(II)B mit dem bakteriellen σ -Faktor.	90
B) Analyse von Backtracking	93
VI) Zusammenfassung	96
VII) Summary	98
VIII) Literaturverzeichnis	100
IX) Anhang	
1. Abkürzungen	119
2. Danksagung	121
3. Erklärung	122

I) Einleitung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Transkriptionssystem von *Pyrococcus furiosus*. Dieser Organismus wurde 1986 aus heißen marinen Sedimenten bei *Porto di Levante* auf der Insel *Vulcano* in Italien isoliert (Fiala und Stetter, 1986). *Pyrococcus* (lat. „Feuerball“) gehört den Archaeen an, welche neben Eukaryoten und Bakterien eine eigenständige Domäne des Lebens darstellen (Woese et al., 1990). Archaeen wurden zunächst aus hinsichtlich Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration und Druck extremen Habitaten isoliert. Mittlerweile weiß man, dass sie auch in mesophilen Habitaten sehr häufig vorkommen, wie beispielsweise den Ozeanen (DeLong, 1998).

Archaeen zeichnen sich durch Etherlipide der Zellmembran (Koga und Morii, 2007) aus, sind Einzeller und besitzen meist ein einzelnes ringförmige Chromosom. Ihre Gene sind oftmals in Operons organisiert. Damit erinnern sie in vielerlei Hinsicht an Bakterien, weshalb sie früher auch als „Archaeobakterien“ (griech. *archaios* „uralt“, „ursprünglich“) bezeichnet wurden (Woese et al., 1990).

Interessanter Weise ähnelt die archaeelle Enzymausstattung zur Prozessierung der genetischen Information (Replikation (Kelman und White, 2005), DNA-Reperatur (Kelman und White, 2005), Transkription (Geiduschek und Ouhammouch, 2005), RNA-Metabolismus (Hartung und Hopfner, 2009) und Translation (Bell und Jackson, 1998)) mehr der der Eukaryoten, wobei in Archaeen die Anzahl der involvierten Faktoren generell geringer ist. So stellt auch die archaeelle Transkriptionsmaschinerie eine vereinfachte Form der eukaryotischen dar (Huet et al., 1983; Werner, 2008). Die Untersuchung der Transkription in Archaeen verschafft somit nicht nur Einblicke in die Biologie archaeeller Zellen, sondern lässt auch Rückschlüsse auf die experimentell begrenzt zugängliche Transkriptionsmaschinerie von Eukaryoten zu. Ein Vergleich der Funktionsweisen von in Archaeen und Eukaryoten konservierten Faktoren kann unser durch Sequenz- und Strukturanalysen erlangtes evolutionsbiologisches Verständnis vertiefen.

Die Verwendung des hyperthermophilen Organismus *P. furiosus* zum Studium der archaeellen Transkription bringt mehrere Vorteile mit sich. Der Organismus kann heterotroph auf einem breiten Spektrum an Substraten wachsen (Stärke, Pepton, komplexen organischen Substraten, Casein, Maltose). Bei optimalen Bedingungen (100°C, pH 7) erreicht *P. furiosus* bei einer Verdoppelungsrate von 37 min sehr hohe Zelldichten, was für die Produktion der notwendigen Zellmassen zur Isolierung der endogenen RNA Polymerase (RNAP) sehr nützlich ist (Fiala und Stetter, 1986). Obwohl der Organismus strikt anaerob wächst, kann die Reinigung sowie Untersuchung der RNAP unter aeroben Versuchsbedingungen erfolgen (Hethke et al., 1996). Außerdem können alle generellen Transkriptionsfaktoren, verschiedensten Transkriptionsregulatoren, sowie die elf einzelnen RNAP Untereinheiten in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden (Hausner et al., 1996; Goede et al., 2006). Die RNAP von *P. furiosus* kann aus ihren einzelnen Untereinheiten rekonstituiert werden, was die Untersuchung potentiell letaler RNAP Mutanten ermöglicht

(Naji et al., 2007; Naji et al., 2008). Da die Sequenz des Genoms von *P. furiosus* bekannt ist (Robb et al., 2001), können Faktoren der Transkriptionsmaschinerie effizient identifiziert, kloniert und charakterisiert werden. Dies birgt auch das Potential für die geamtgenomische Ansätze wie ChIP-on-Chip Analysen. Die cryoelektronenmikroskopische (Cryo-EM) Struktur der RNAP erlaubt eine relativ genaue Vorhersage der RNAP-Architektur von *P. furiosus* (Kusser et al., 2008). Das Transkriptionssystem von *P. furiosus* wird seit über 15 Jahren im Labor von Prof. Dr. Thomm mittels unterschiedlichster biochemischen Ansätze *in vitro* charakterisiert. Kürzlich ist es (Waage et al., 2010) gelungen, ein genetisches System für diesen Organismus zu entwickeln, was in Zukunft die Charakterisierung der Transkriptionsmaschinerie von *P. furiosus* um *in vivo* Daten bereichern wird.

1. Zusammensetzung und Evolution von *multisubunit* RNAPs

Alle Zellen bewerkstelligen die Transkription mit einer oder mehreren *multisubunit* DNA-abhängigen RNAPs, welche aus 5-15 Untereinheiten bestehen und ein Molekulargewicht von bis zu 0.7 MDa aufweisen (Cramer et al., 2008). Sie umfassen die RNAPs aus Bakterien (Darst, 2001), Chloroplasten (PEP, *plastid encoded polymerase*) (Kanamaru und Tanaka, 2004), Archaeen (Grohmann et al., 2009a) und 5 eukaryotische Typen (Pol I, II, III, IV und V) (Cramer et al., 2008; Pikaard et al., 2008; Cramer und Arnold, 2009; Ream et al., 2009). Ihnen gegenüber stehen die *singlesubunit* RNAPs aus einem einzigen Polypeptid wie sie von Mitochondrien (Gaspari et al., 2004) und Chloroplasten (NEP, *nuclear encoded polymerase*) (Kanamaru und Tanaka, 2004) genutzt werden. Diese wiederum sind verwandt mit den *singlesubunit* RNAPs aus Bakteriophagen wie T7, T3 oder SP6, von welchen die T7-RNAP strukturell und funktionell am besten charakterisiert ist (Steitz, 2009).

In Eukaryoten synthetisiert Pol I hauptsächlich ribosomale RNA, Pol II die pre-messenger RNA und small nuclear RNAs, Pol III die tRNAs und andere kleine RNAs. Pol IV und V kommen nur in Pflanzen vor, sind nicht essentiell, und spielen eine Rolle bei der siRNA-vermittelten DNA-Methylierung sowie Gen-Stillegung (*Gene-Silencing*) (Pikaard et al., 2008; Wierzbicki et al., 2008; Ream et al., 2009). Beide ähneln am meisten Pol II (Ream et al., 2009). Die archaeelle RNAP ist ebenfalls am nächsten mit Pol II verwandt (Langer et al., 1995). In Archaeen wie in Bakterien katalysiert eine einzige RNAP die Synthese aller zellulären RNAs (Darst, 2001; Grohmann et al., 2009a).

Abb. 1 zeigt einen Vergleich der Untereinheitenzusammensetzung sowie der Topologie der bakteriellen, archaeellen und der essentiellen eukaryotischen RNAPs. Sequenzvergleiche der RNAP-Untereinheiten legten bereits vor den Strukturanalysen nahe, dass alle *multisubunit* RNAPs auf ein gemeinsames Vorläuferenzym zurückgehen (Huet et al., 1983). Die bakterielle RNAP besitzt mit 5 Untereinheiten die einfachste Ausstattung und jede bakterielle Untereinheit hat ein archaeelles/eukaryotisches Homolog (Sweetser et al., 1987; Ebright, 2000). Die beiden größten Untereinheiten, β und β' in Bakterien (Zhang et al., 1999), Rpb1 und Rpb2 in Pol II (Cramer et al., 2001), sowie A und B in Archaeen (Hirata et al.,

2008b) machen etwa zwei Drittel der RNAP aus und bilden das katalytische Zentrum. In Archaeen können eine oder beide der großen Untereinheiten getrennt vorliegen, in *P. furiosus* sowie in den meisten anderen Archaeen trifft dies auf das Rpb1 Homologe zu, die entsprechenden Untereinheiten werden als A' und A'' bezeichnet (Puhler et al., 1989). In Methanogenen und extrem Halophilen ist auch das Rpb2 Homologe in zwei Untereinheiten gespalten (B' und B''). Zwei kleinere Untereinheiten, das α -Homodimer in Bakterien, das Rpb3/Rpb11-Heterodimer in Eukaryoten sowie D/L in Archaeen verankern die beiden großen Untereinheiten (Abb. 1 b). Eine Besonderheit der Untereinheit D bzw. mancher eukaryotischer Homologen ist das Vorkommen von einem (*Sulfolobus* Genera, Pflanzen und Protozoen) oder zwei (*Archaeoglobus fulgidus*, manche Methanogene) Schwefel-Eisencluster-Motiven. Halobacterium, die *Thermococcus* und *Pyrococcus* Genera besitzen hingegen keinen Schwefel-Eisencluster. Dem Schwefel-Eisencluster in *Sulfolobus solfataricus* scheint eine strukturerhaltende Funktion zuzukommen. Es wurde weiter spekuliert, dass er wie die C-terminale Domäne der α -Untereinheit in Bakterien als Sensor für oxidativen Stress (Lawson et al., 2004) oder für die Eisenverfügbarkeit dienen könnte (Hirata und Murakami, 2009). Die kleinste bakterielle Untereinheit ω entspricht Rpb6 in Pol II bzw. K in Archaeen (Minakhin et al., 2001).

In Eukaryoten und Archaeen wird zwei weiteren kleinen Untereinheiten, nämlich Rpb10/N und Rpb12/P, aufgrund ihrer Lokalisation an der RNAP-Rückseite (Abb. 1b) Assemblierungsfunktion zugeschrieben (Grohmann et al., 2009a). Der archaeellen Untereinheit H fehlt die C-terminale *Assembly*-Domäne des eukaryotischen Gegenstückes Rpb5 (Kusser et al., 2008). Zu Rpb9 gibt es keine homologe Untereinheit in Archaeen, jedoch ist der Transkriptionsfaktor S (TF(II)S) verwandt mit Rpb9 (Langer et al., 1995). Rpb9 könnte also durch Genduplikation entstanden, und nach Verlust der RNA-Spaltungsfunktion mit Pol II permanent assoziiert sein. Dies geht einher mit dem evolutionsbiologischen Entstehungsmodell der *multisubunit* RNAPs, welches besagt dass die gegenüber den Bakterien zusätzlichen Untereinheiten in Eukaryoten und Archaeen ehemalige Transkriptionsfaktoren waren, die mit der Zeit dauerhaft von der RNAP gebunden wurden. Ein gutes Indiz dafür liefern ebenfalls die erst kürzlich durch Sequenzvergleiche erhaltene Daten, welche Homologien von Pol II Transkriptionsfaktoren zu Pol I und Pol III Untereinheiten aufzeigen (Kuhn et al., 2007; Carter und Drouin, 2009) (Abb. 1a).

Eine aktuelle Strukturanalyse der archaeellen RNAP von *Sulfolobus shibatae* bestätigt, dass ein kürzlich durch Sequenzvergleiche entdecktes Homolog zu Rpb8 (Untereinheit G oder Rpo8) einen Bestandteil der RNAP von Crenarchaeoten bildet (Koonin et al., 2007; Kwapisz et al., 2008; Korkhin et al., 2009). Rpo8 bindet an der archaeellen RNAP an einer Rpb8 entsprechenden Position außen an das Rpb1 Homologe A' (Abb. 1). Darüber hinaus konnte eine Archaeen-spezifische 13. Untereinheit (Rpo13) identifiziert werden, für die die Struktur eines Drei-Helix-Bündels vorhergesagt wird. In der Kristallstruktur aufgelöst wurden die beiden N-terminalen α -Helices, die ein *helix-turn-helix* (HTH)-Motiv bilden und in einer Vertiefung zwischen *Clamp* (Abb. 1b) und H binden (Korkhin et al., 2009). Die bakteriellen RNAPs aus *Thermus aquaticus* (Zhang et al., 1999) und *Thermus thermophilus* (Vassylyev et al.,

2002) besitzen an dieser Stelle eine Insertion in der β' Untereinheit, bestehend aus einem zwei-strängigen, antiparallelen β -Faltblatt und einer α -Helix. In Eukaryoten wird diese Position partiell von der C-terminalen Domäne von Rpb5 besetzt. Die Autoren spekulieren, dass die im Kristall nicht sichtbare C-terminale Helix mit der DNA im offenen Komplex interagieren könnte. Das Protein ist innerhalb der Crenarchaeen konserviert, in Euryarchaeen wurde zumindest über Sequenzvergleiche kein Rpo13-Homologes identifiziert (Koonin et al., 2007; Kwapisz et al., 2008).

Die bislang genannten Untereinheiten in Archaeen (B, A', A'', D, L, N, P, K, H und in Crenarchaeen zusätzlich G, Rpo13), ihre eukaryotischen Homologen in Pol II (Rpb1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11 und 12) bilden den auch als *Core*-Enzym bezeichneten Teil der RNAP (Cramer et al., 2001). Die für Eukaryoten und Archaeen spezifischen Untereinheiten Rpb4/7 bzw. E'/F vervollständigen das Enzym. Die Kristallstrukturen von Pol II (Armache et al., 2003; Bushnell und Kornberg, 2003) und der archaeellen RNAP (Korkhin et al., 2009), sowie die vorhandenen Homologiemodelle von Pol I (Kuhn et al., 2007) und Pol III (Jasiak et al., 2006) jeweils mit allen Untereinheiten zeigen, dass das Heterodimer oberhalb von Rpb6/K entspringt, und einen vom *Core*-Enzym wegstehenden Keil (*Stalk*) bildet (Abb. 1b). Rpb6 verankert das Rpb4/7 Heterodimer an der RNAP (Tan et al., 2003). Die Pol I Homologen A14/43 (Meka et al., 2003) und C17/25 (Siaut et al., 2003) bilden ebenfalls ein Heterodimer in Lösung. Das A14/43 Dimer bindet RNA *in vitro* (Meka et al., 2003) und wird auch über Rpb6 am Pol I – Core stabilisiert (Peyroche et al., 2002).

Gereinigten Fraktionen der RNAP von *S. cerevisiae* weisen substöchiometrische Mengen an Rpb4/7 auf, was lange Zeit die Strukturaufklärung der Pol II maßgeblich erschwerte (Cramer, 2004). Die Zugabe gereinigter Fraktionen oder rekombinanter Versionen des *Stalk*-Heterodimers kann die *Core*-RNAP strukturell (Armache et al., 2003; Bushnell und Kornberg, 2003) und funktionell (Edwards et al., 1991; Naji et al., 2007) komplettieren. Während Rpb7 für *S. cerevisiae* essentiell ist, besitzt die *RPB4Δ* Hefemutante unter optimalen Bedingungen kaum einen Wachstumsdefekt, ist jedoch sensitiv gegenüber unterschiedlichen Stressbedingungen, darunter erhöhte oder erniedrigte Temperatur (Choder, 2004). Untereinheit E' ist für *Thermococcus kodakaraensis* ebenfalls essentiell, während eine genomische Deletion des Gens für F einen temperaturabhängigen Wachstumsphänotyp erzeugt (Hirata et al., 2008a). Zunächst konnte Rpb4/7 eine Rolle bei der Promotor-abhängigen Initiation (Edwards et al., 1991) und zwar im Anschluss an die Assoziation der RNAP an den Promotor (Orlicky et al., 2001) zugeschrieben werden. In der archaeellen rekonstituierten *Core*-RNAP von *P. furiosus* stimuliert hauptsächlich die E' Untereinheit das Aufschmelzen der Promotor-DNA insbesondere bei niedrigen Temperaturen (Naji et al., 2007). Es entstand die Idee, dass der *Stalk* im Laufe des Transkriptionszykluses assemblieren und deassemblieren kann (Edwards et al., 1991). Das relative Verhältnis von Pol II mit und ohne Rpb4/7 ist in *S. cerevisiae* abhängig von der Wachstumsphase (Choder und Young, 1993). Kürzlich wurde gezeigt, dass ein Austausch von E'/F an der archaeellen RNAP von *Methanocaldococcus jannaschii* in Lösung nicht stattfindet (Grohmann et al., 2009b). *In vitro*

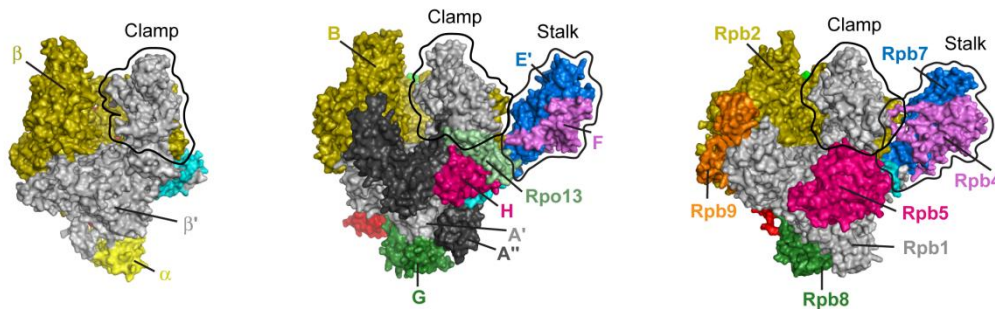
a

		Eukaryoten			
Bakterien	Archaeen	Pol II	Pol I	Pol III	
β'	A' und A''	Rpb1	A190	C160	große, katalytische Untereinheiten
β	B' und B''	Rpb2	A135	C128	
α	D	Rpb3	AC40		
α	L	Rpb11	AC19		Assemblierung, Verankerung
	N	Rpb10			
	P	Rpb12			
ω	K	Rpb6			Stalk
	H	Rpb5			
	G*	Rpb8			
	F	Rpb4	A14	C17	RNA-Spaltung
	E'	Rpb7	A43	C25	
	(TFS/M)	Rpb9 (IIS)	A12	C11	
Pol II GTFs, Pol I und Pol III		(IIF α)	A49	C37	
		(IIF β)	A34.5	C53	
Pol II GTFs, Pol III		(IIE α)		C82	
	aRpc34*	(IIE β)		C34	
				C31	

* nur Crenarchaeoten
() GTFs

b

Vorderansicht



Hinteransicht

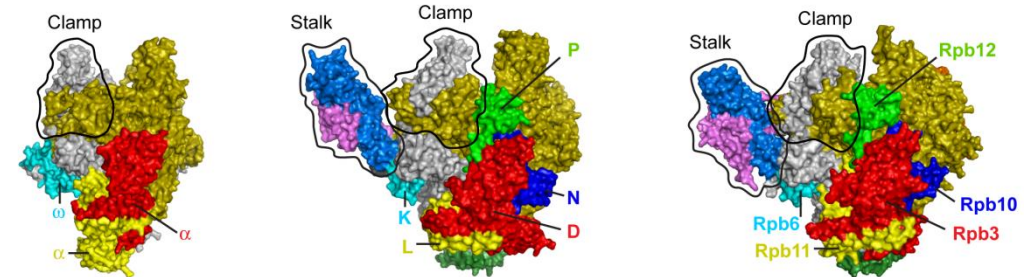
*Thermus aquaticus**Sulfolobus shibatae**Saccharomyces cerevisiae* Pol II

Abb. 1. Zusammensetzung und Struktur von multisubunit RNAPs. (a) Homologiemuster der Untereinheiten in den RNAPs von Bakterien, Archaeen und Eukaryoten. Die Spezifität von Untereinheiten für einen RNAP Typ ist links, die Funktionen der Untereinheiten rechts der Tabelle vermerkt. Die Farbgebung ist angelehnt an (Cramer et al., 2001). GTF, generelle Transkriptionsfaktoren. (b) Gesamttopologie einer bakteriellen (*Thermus aquaticus*, PDB 1HQM, (Minakhin et al., 2001)), einer archaeellen (*Sulfolobus shibatae*, PDB 2WAQ, (Korkhin et al., 2009)) und einer eukaryotischen (*Saccharomyces cerevisiae* Pol II, PDB 1WCM, (Armache et al., 2005)) RNAP. Die Farbkodierung entspricht der in (a).

stimuliert E'/F außerdem die Elongationseffizienz der *M. jannaschii* RNAP (Hirtreiter et al., 2009). ChIP-on-Chip Daten aus Hefe zeigen weiter, dass transkribierte Gene in gleicher Weise mit Rpb3 und Rpb7 besetzt sind, also während der Transkription keine Deassemblierung des *Stalks* vom *Core*-Enzym stattfindet. Außerdem wird eine Rolle für Rpb4 bei der Elongation vor allem von GC-reichen Sequenzen vorgeschlagen (Jasiak et al., 2008; Verma-Gaur et al., 2008). In gereinigten Fraktionen der *Schizosaccharomyces pombe* (Sakurai et al., 1999) und humanen Pol II (Khazak et al., 1998) jedenfalls liegt das Rpb4/7 Heterodimer stöchiometrisch vor.

2. Struktur und Regulation von *multisubunit* RNAPs

Die meisten Strukturdaten wurden in den letzten Jahren von Pol II aus *S. cerevisiae* gesammelt (einen Überblick gibt (Cramer et al., 2008)). Von Pol I und Pol III existieren Homologiemodelle, welche durch die Kombination von Kristallstrukturen der Heterodimere A14/43 bzw. C17/25 mit einer Cryo-EM Struktur des entsprechenden *Core*-Enzyms bei 15 bzw. 17 Å entstanden sind (Jasiak et al., 2006; Kuhn et al., 2007). In Archaeen wurde zunächst die Cryo-EM Struktur von *P. furiosus* veröffentlicht (Kusser et al., 2008), seit kurzem sind auch Röntgenkristallstrukturen der RNAPs zweier Crenarchaeen, *Sulfolobus solfataricus* (Hirata et al., 2008b) und *Sulfolobus shibatae* (Korkhin et al., 2009) verfügbar.

Allen RNAPs ist eine Krabbenscherenstruktur (*Crab-Claw*) gemeinsam (Zhang et al., 1999; Cramer et al., 2000; Hirata et al., 2008b). Dabei bildet jeweils eine der beiden katalytischen Untereinheiten eine der beiden Scherenhälften (Abb. 2). Dazwischen eröffnet sich ein zirka 27 Å weiter Kanal (*Channel*), der als DNA-bindende Spalte (*cleft*) fungiert. Hinten wird der Kanal von einer hauptsächlich aus β -Faltblättern bestehenden Wand (*Wall*, in Bakterien *Flap*) begrenzt. An der Basis und nahe des Mittelpunkts des Enzyms befindet sich das katalytische Zentrum mit zwei Mg^{2+} Ionen, von welchen eines (*Metal A*) durch 3 invariante Argininreste fixiert wird, während das zweite (*Metal B*) mobil ist (Cramer et al., 2001; Westover et al., 2004). Direkt unterhalb des aktiven Zentrums an der Basis der *Cleft* führt ein sekundärer Kanal (*Secondary Channel*) nach außen. Diese auch als Pore (*Pore*) bezeichnete Öffnung erinnert an einen umgekehrten Trichter und wird außen von zwei α -Helices begrenzt (*Funnel*). Ebenfalls an der Basis der *Cleft* schräg oberhalb von *Metal A* überbrückt die sogenannte *Bridge Helix* die beiden Scherenhälften (Cramer et al., 2001). Direkt darunter und neben *Metal A* befindet sich (s. unten, Abb. 6) der mobile *Trigger Loop* (Vassylyev et al., 2002; Kettenberger et al., 2003). Darüber hinaus ragen in die Spalte mehrere *Cleft Loops* (*Rudder* und *Lid* in Rpb1, *Fork Loop 1* und *2* von Rpb2) welche den Weg des DNA-RNA Hybrides (s. unten, Abb. 6) von beiden Seiten her säumen (Gnatt et al., 2001).

Die von Rpb2 gebildete Seitenwand der *Cleft* besteht aus *Protrusion* und *Lobe*. Die andere,

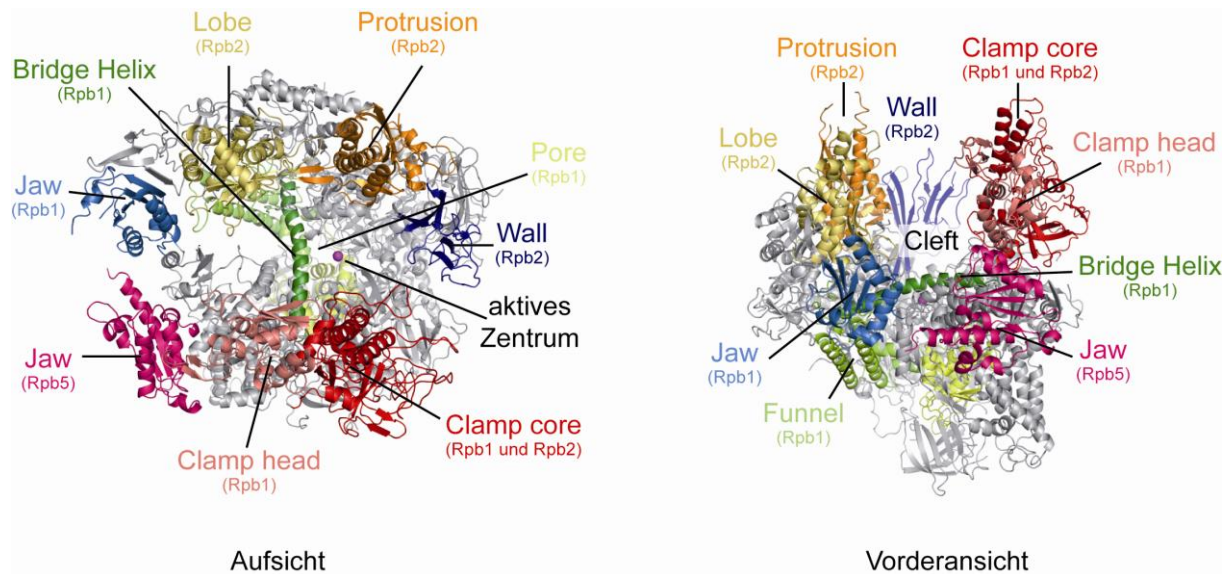


Abb. 2. Strukturelemente von multisubunit RNAPs. Wichtigen Bereiche von multisubunit RNAPs sind exemplarisch in der 10-Untereinheiten Pol II Struktur von *S. cerevisiae* (ohne Rpb4/7, PDB 1I50 (Cramer et al., 2001)) gezeigt. Die Aufsicht lässt das aktive Zentrum im Mittelpunkt des Enzyms erkennen. Die Bridge Helix verbindet die beiden „Krabberscherenhälften“, die jeweils aus hauptsächlich Rpb 1 (Clamp) und Rpb2 (Lobe, Protrusion) gebildet werden. Der Blick in der Vorderansicht zeigt die Cleft, die hinten von Wall begrenzt wird sowie die Lage von Funnel, welcher den äußeren Rand der Pore bzw. des sekundären Kanals bildet.

hauptsächlich von Rpb1, zu geringem Anteil von Rpb2 gebildete Seitenwand wird als *Clamp* bezeichnet (vgl. auch Abb. 1b). An der Basis der *Clamp* Außenseite bindet Rpb6/K und der vom Rpb4/7-Heterodimer bzw. dessen Homologen gebildete Keil. Ein Vergleich der *S. cerevisiae* RNAP Kristalle mit 10 (Cramer et al., 2001) und 12 (Armache et al., 2003; Bushnell und Kornberg, 2003; Armache et al., 2005) Untereinheiten zeigt im Detail, dass das hauptsächlich von Rpb1 und zu geringem Ausmaß von Rpb2 gebildete *Clamp*-Modul mobil ist, sich in Gegenwart der Rpb4/7 Untereinheiten um etwa 30° über das aktive Zentrum dreht und dabei die Cleft einengt (Cramer et al., 2001). In Anwesenheit von Nukleinsäuren ist die *Clamp* ebenfalls geschlossen (Gnatt et al., 2001). Die Strukturen der bakteriellen RNAPs (Zhang et al., 1999; Vassylyev et al., 2002) wiesen bisher nur die geschlossene Konformation der *Clamp* auf.

Die Oberfläche der RNAP ist überwiegend negativ geladen, während die DNA-bindende Spalte positiv geladen ist. Konservierung zwischen den multisubunit RNAPs ist vornehmlich im Bereich rund um das aktive Zentrum und in der Cleft gegeben, was wiederum auf einen gemeinsamen Vorfahren der Enzyme schließen lässt (Sweetser et al., 1987; Cramer et al., 2001; Lane und Darst, 2010).

Die C-terminale Domäne (CTD), welche bei archaeellen und bakteriellen RNAPs nicht vorkommt und in Eukaryoten spezifisch für Pol II ist, besteht aus einer repetitiven Heptapeptidsequenz (YSPTSPS) am C-terminus von Rpb1, deren Modifikationsmuster sich im Laufe des Transkriptionszykluses verändert (Hirose und Ohkuma, 2007). Die CTD befindet sich in der Nähe des RNA-Austrittskanals (RNA exit channel) an der Pol II-Rückseite, deren Oberflächen häufig von transkriptionsregulierenden Faktoren gebunden wird. An die CTD binden Faktoren zur Histonmodifizierung, 5'- und 3' RNA-Prozessierung,

und Splicingmaschinerie (Hirose und Ohkuma, 2007). Die *Clamp* wird z.B. in der bakterieller RNAP von NusG (Nickels, 2009) und RfaH (Belogurov et al., 2007), in der archaeellen RNAP von den Elongationsfaktoren Spt4/5 (Hirtreiter et al., 2010), in Pol II vom Hepatitis Delta Antigen (Yamaguchi et al., 2007) gebunden. Das Rpb4/7-Dimer wird für aktivierte Transkription benötigt, ist bei der zellulären Stressantwort, beim Zellzyklus, mRNA-Cytoplasma-Export, bei transkriptionsgekoppelter DNA-Reparatur (TCR) und Sporulation involviert. Rpb4/7 Interaktionspartner sind in Hefe z.B. RNA-3'-Prozessierungsfaktoren, in Menschen Wachstumsfaktoren (Choder, 2004; Sampath und Sadhale, 2005).

3. Initiation der Transkription bei Pol II und der archaeellen RNAP

Allen bislang beschriebenen RNAPs ist gemeinsam, dass sie eine zur DNA komplementäre RNA synthetisieren können. Für die spezifische Bindung an den Promotor, sowie die Festlegung des Startpunkts der RNA-Synthese benötigen sie generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) (Dvir et al., 2001; Woychik und Hampsey, 2002).

In Bakterien tritt ein genspezifischer Sigma(σ)-Faktor sowohl mit dem *Core*-Enzym ($\beta'\beta\alpha\alpha\omega$) als auch mit definierten Bereichen der Promotor-DNA (-35 und -10 Elemente) in Wechselwirkung. Damit ist ein einzelnes Polypeptid für die RNAP-Bindung am bakteriellen Promotor sowie das Einleiten der Transkriptionsinitiation entscheidend (Campbell et al., 2008).

In Eukaryoten sind demgegenüber eine Vielzahl an Faktoren für die Bindung der RNAP notwendig. Archaeen besitzen einen homologen aber im Vergleich zu den Eukaryoten vereinfachten Satz an GTFs, der dem des Pol II Initiationsapparats am nächsten kommt (Langer et al., 1995; Bartlett, 2005). Der in Pol II standardmäßig untersuchte Ablauf bei Promotoren mit TATA-Box ereignet sich folgendermaßen (Dvir et al., 2001; Woychik und Hampsey, 2002): zunächst bindet die TBP (*TATA-binding protein*) Untereinheit des TFIID Komplexes (12 TAFs in Hefe, *TBP associated factors*) an die TATA-box und induziert dabei eine Biegung in der DNA von etwa 90°. TFIIA kann diesen Komplex stabilisieren. Durch TFIIB erfolgt die Bindung der nicht-phosphorylierten Pol II zusammen mit TFIIF (in Metazoen/ Hefe ein Tetramer aus je zwei TFIIF α /RAP74 und zwei TFIIF β /RAP30 Untereinheiten). TFIIF ist Voraussetzung für die Assoziation von TFIIE (in Metazoen ein Dimer aus TFIIE α und TFIIE β , in Hefe ein Trimer aus Tgf1, Tgf2 und Tgf3) und TFIIH (10 Untereinheiten). TFIIE wird darüber hinaus für die Bildung des offenen Komplexes benötigt, was durch Aufschmelzen der DNA in Abhängigkeit von ATP-Hydrolyse durch die DNA-Helikase Aktivitäten (SSL2/XPB und RAD3/XPD) in TFIIH erfolgt. Bei der Initiation wird die CTD durch die ebenfalls in TFIIH enthaltene Kinase-Aktivität (KIN28/CDK7, cyclinH) phosphoryliert, wodurch das Verlassen des Promotors (*Promoter-Escape*) und das Voranschreiten in die Elongationsphase ermöglicht werden. TFIIF, -E und -H unterdrücken außerdem Promotor-proximales Pausieren der RNAP (Dvir et al., 2001; Woychik und Hampsey, 2002).

In Archaeen gibt es demgegenüber nur 3 GTFs, nämlich TBP, TFB und TFE, von denen lediglich TBP und TFB für die Promotor-spezifische Initiation *in vitro* essentiell sind (Qureshi et al., 1995; Hausner et al., 1996). Während die GTFs der Pol II Maschinerie aus zirka 30 Polypeptiden mit etwa 1560 kDa bestehen, weisen die drei archaeellen Proteine nur zirka 80 kDa auf. Das Aufschmelzen der Promotor-DNA findet ohne ATP-Hydrolyse statt und es gibt bislang keine Hinweise auf Transkriptionszyklus-abhängige Phosphorylierung der archaeellen RNAP (Hausner und Thomm, 2001).

Archaeelles TBP besitzt ebenso wie eukaryotisches TBP eine symmetrische, sattelförmige Struktur welche von zwei homologen Domänen gebildet werden (Nikolov et al., 1992). Die Sattelunterseite ist für die Bindung an die TATA-Box verantwortlich, wobei die Bindung in beide Richtungen erfolgen kann (Cox et al., 1997; Kosa et al., 1997). Der Amino-terminale Teil des eukaryotischen TBPs ist unterschiedlich lange und fehlt in Archaeen. Archaeen hingegen besitzen 6-10 saure Aminosäuren am C-terminus, die in eukaryotischen TBPs nicht vorkommen (Bell und Jackson, 1998).

Archaeelles TFE entspricht dem N-terminalen Teil der großen TFII α -Untereinheit (Kyrpides und Ouzounis, 1999). Dieser besteht aus einem *winged-helix* (WH)-Motiv, welches eine Sonderform des HTH-Motivs darstellt (Brennan, 1993) und typischer Weise in Transkriptionsfaktoren und DNA-bindenden Proteinen vorkommt (Gajiwala und Burley, 2000). Tatsächlich bindet TFE, wenn auch nur schwach, an einzelsträngige DNA (Grünberg et al., 2007). Die Struktur des *S. solfataricus* WH-Motivs konnte gelöst werden und ist aufgrund der guten Konservierung innerhalb der Archaeen sehr wahrscheinlich auch auf andere archaeelle TFEs anwendbar. Die Konservierung bei TFII α ist geringer, aber ausreichend, um Homologiemodelle zu erstellen. Das WH-Motiv von TF(II)E ist bislang einzigartig, da es zusätzlich zu den kanonischen drei α -Helices eine C- und eine N-terminale α -Helix aufweist. Ein im zentralen Bereich von TFE gelegenes ebenfalls konserviertes *Zinc-Binding* Motiv sowie ein vorhergesagtes HTH-Motiv am C-terminus kristallisierten nicht (Meinhart et al., 2003). Da TFE mit der RNAP und TBP interagiert, wurde vorgeschlagen, dass es diese im Initiationskomplex verbindet (Bell et al., 2001). TFE hat einen leicht stimulierenden Effekt auf die Transkription bei limitierenden TBP Konzentrationen auf schwachen Promotoren indem es den offenen Präinitiationskomplex stabilisiert (Bell et al., 2001; Hanzelka et al., 2001). Die Wirkung von TFE hängt vom E'/F-Dimer ab (Ouhammouch et al., 2004; Naji et al., 2007). *In vitro* KMnO₄-Footprint Analysen haben gezeigt, dass E' und TFE ausreichend sind um die Öffnung der Promotor-DNA zu stimulieren, wobei niedrige Temperaturen den Effekt verstärken (Naji et al., 2007). *In vivo* wird TFE bei niedrigeren Temperaturen im psychrophilen Archaeon *Methanococcoides burtonii* hochreguliert (Goodchild et al., 2004).

4. Transkriptionsfaktor (II)B

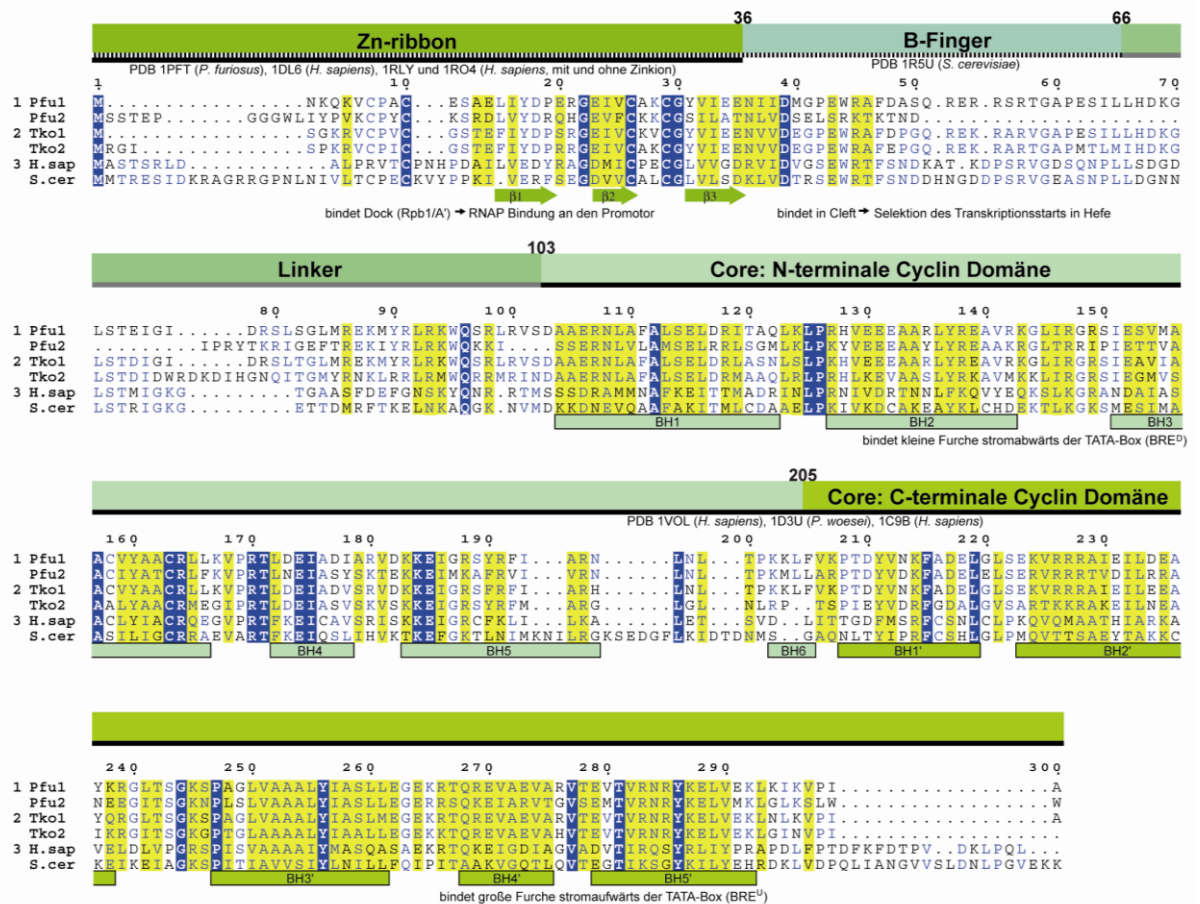
TFIIB wurde in Hefe als ein Faktor identifiziert, der den Transkriptionsstartpunkt zu verändert (Gen SUA7) (Pinto et al., 1992). TF(II)B ist ein einzelnes Polypeptid (Abb. 3a) und in Eukaryoten und Archaeen hochkonserviert (Ouzounis und Sander, 1992; Creti et al., 1993). Es besteht aus einer N-terminalen *Zinc-Ribbon* Domäne (Zn-Ribbon) (Zhu et al., 1996), die die RNAP an der auf der Hinterseite des Enzyms gelegenen *Dock*-Domäne bindet (Chen und Hahn, 2003) und einer proteaseresistenten C-terminalen *Core*-Domäne (TFIIBc), die sich aus zwei *Cyclin-like* Domänen zusammensetzt (Malik et al., 1993; Bagby et al., 1995) (Abb. 3 b). Eine Reihe an NMR-Analysen konnte die Struktur des *Zn-Ribbons* aus unterschiedlichen Organismen aufklären (Zhu et al., 1996; Chen et al., 2000; Ghosh et al., 2004). TFIIBc interagiert sowohl mit TBP (Malik et al., 1993) als auch mit der DNA und konnte bereits mehrmals kristallisiert werden (Nikolov et al., 1995; Littlefield et al., 1999; Tsai und Sigler, 2000). Insbesondere die Kristallstruktur des ternären Komplexes aus DNA, TBP und TFIIBc von (Tsai und Sigler, 2000) macht ersichtlich, dass TFIIB sequenzspezifische Kontakte mit der DNA stromaufwärts und stromabwärts der TATA-box herstellt (BRE^U/BRE^D , *upstream/downstream B-recognition element*). Promotoranalysen belegen, dass die Kontakte von TF(II)Bc an BRE in Eukaryoten und Archaeen für die korrekte Orientierung des Initiationskomplexes sorgen (Lagrange et al., 1998; Qureshi und Jackson, 1998; Bell et al., 1999). In einer Co-Kristallstruktur der Pol II mit TFIIB aus Hefe ist angrenzend an den *Zn-Ribbon* ein TFIIB-Abschnitt (*B-Finger*) zu sehen, welcher in die *Cleft* der RNAP ragt (Bushnell et al., 2004). Der Bereich zwischen *B-Finger* und TFIIBc wurde als *Linker* bezeichnet, über den zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Strukturinformation vorhanden war.

Während Eukaryoten nur ein TFIIB besitzen, kodieren Archaeen meistens für zwei, Halophile sogar für bis zu 7 TFBs und 6 TBPs (Werner, 2007). Oftmals weisen die zusätzlichen TFB-Kopien N- oder C-terminale Verkürzungen bzw. Abweichungen in einem der funktionellen Bereiche auf (Werner, 2007). Die Vermutung liegt nahe, dass verschiedene TBP-TFB Sets ähnlich den verschiedenen σ -Faktoren in Bakterien zur differenziellen Genexpression benutzt werden (Facciotti et al., 2007). Bislang gibt es dazu jedoch wenige schlüssige Daten.

TFB2 von *P. furiosus* zeichnet sich durch eine ausgesprochen lange Deletion des *B-Finger* Bereiches aus und erlaubt gegenüber TFB1 nur verringerte Transkriptionsaktivität *in vitro* (Micorescu et al., 2008). Interessanter Weise wird TFB2 *in vivo* bei Hitzeschock hochreguliert (Shockley et al., 2003), eine Stimulierung der Transkription bei erhöhten Temperaturen oder auf hitzeinduzierten Promotoren *in vitro* ist jedoch nicht nachweisbar. TFE wirkt sich stimulierend auf die Transkriptionsaktivität in Gegenwart von TFB2 aus, was auf eine Stabilisierung des offenen Komplexes zurückzuführen ist (Micorescu et al., 2008).

TFB1 und TFB2 von *Thermococcus kodakaraensis* besitzen in *in vitro* Transkriptionen unterschiedliche Salzoptima. Die Lebensfähigkeit des nahe mit *P. furiosus* verwandten Archaeons ist nicht beeinträchtigt, unabhängig davon welche von den beiden TFB-Varianten

a



b

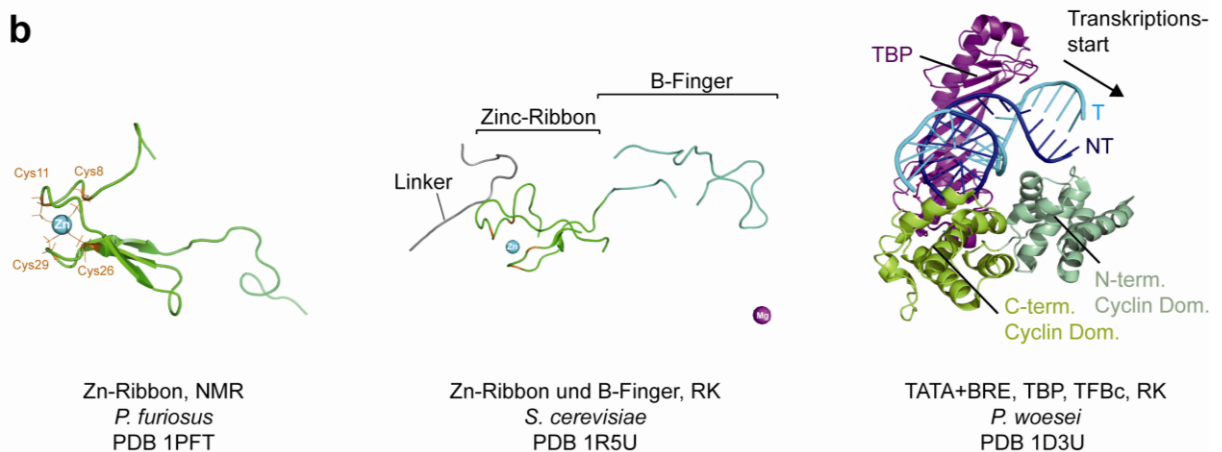


Abb. 3. Strukturinformation über TF(II)B zu Beginn dieser Arbeit. (a) Sequenzalignment und Primärstruktur von archaeellen TFB und eukarytischen TFIIB Sequenzen. Die Nummerierung bezieht sich auf TFB1 von *P. furiosus*. Unterhalb des Sequenzalignments sind bekannte Sekundärstrukturen als Pfeil für einen β -Strang oder als Balken für eine α -Helix sowie die zugehörigen PDB-Einträge angegeben. Zn-Ribbon, Zinc-Ribbon. PIC, Präinitiationskomplex. TSS, Transkriptionsstartstellenselektion. BH, α -Helix in der N-terminal Cyclin Domäne. BH', α -Helix in der C-terminal Cyclin Domäne. BRE^{D/U}, downstream/upstream B-recognition element. Pfu1 und Pfu2, *Pyrococcus furiosus* TFB1 und TFB2. Tko1 und Tko2, *Thermococcus kodakaraensis* TFB1 und TFB2. H.sap, *Homo sapiens* TFIIB. S.cer, *Saccharomyces cerevisiae* TFIIB. **(b)** Darstellung der strukturell aufgelösten Bereiche von TF(II)B. In der Struktur des Zn-Ribbons sind die Zink-koordinierenden Cysteine (braun) eingezeichnet. Die Farbkodierung der einzelnen Abschnitte von TFB entspricht der in (a). RK, Röntgenkristallographie. TFBc, TFB Core Domäne.

genomisch deletiert wird. Dies impliziert dass die beiden TFB-Varianten redundante Funktionen einnehmen. Die TFB Versionen in diesem Organismus weisen jedoch im Gegensatz zu TFB2 gegenüber TFB1 in *P. furiosus* keine größeren Deletionen auf (Santangelo et al., 2007; Micorescu et al., 2008) (Abb. 3a).

Kürzlich konnte für den hitzeinduzierbaren *hsp5*-Promotor von *Halobacterium salinarium* gezeigt werden, dass dessen TATA-Box und BRE-Sequenz ausreichend sind, um ein nicht-hitzereguliertes Gen temperaturabhängig zu exprimieren. *In vitro* wird dieser Core Promotor von den bei Hitzeshock hochregulierten TFB2 aus *Haloferax volcanii* sowie TFBb von *Halobacterium* sp. NRC-1 spezifisch und temperaturabhängig gebunden (Lu et al., 2008).

Eine interessante Abweichung stellt das UV-induzierbare TFB3 von *S. solfataricus* dar. Es handelt sich um eine mit der RNAP aufgereinigte, stark verkürzte TFB-Variante ohne *B-Finger*, *Linker* und *Core*-Domäne. TFB3 hat, anders als etwa TFB2 von *P. furiosus*, eine stimulierende Wirkung auf die *in vitro* Transkription, wenn TFB1 ebenso in der Reaktion vorhanden ist (Micorescu et al., 2008; Paytubi und White, 2009). Wie TFB1 interagiert TFB3 abhängig von der *Zn-Ribbon* Domäne mit RNAP Untereinheit K im *Two-Hybrid Assay* (Magill et al., 2001). TFB3 kann außerdem mit einem ternären Komplex aus DNA-TBP-TFB1 wechselwirken, interagiert jedoch nicht mit TFB1 alleine. Da TFB1 im Gegensatz zu TFB3 in *S. solfataricus* einen nichtkanonischen *Zn-Ribbon* besitzt, wird angenommen, dass sich die Domänen der beiden TFB-Varianten funktionell ergänzen (Paytubi und White, 2009).

5. Der Präinitiationskomplex

Der Präinitiationskomplex (PIC) ergibt sich durch Assemblierung von TBP, TF(II)B und Pol II/archaeeller RNAP an der Promotor-DNA. Zu Beginn meiner Arbeit waren zwei Strukturmodelle für den PIC vorgeschlagen (Abb. 4).

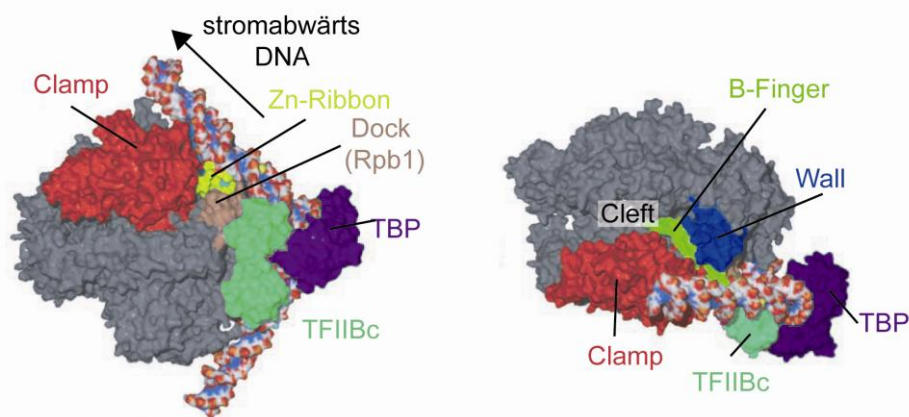
Das erste Modell stammt von (Bushnell et al., 2004) und basiert auf einer Röntgen-Kristallstruktur der RNAP mit TFIIB von Hefe bei einer Auflösung von 4.5 Å. Es sind die N-terminalen 88 Aminosäuren von TFIIB ohne Seitenketten zu erkennen. Wie zuvor aufgrund von *Crosslinking*-Experimenten postuliert (Chen und Hahn, 2003), bindet der *Zn-Ribbon* an die *Dock*-Domäne der RNAP und setzt sich in einer als *B-Finger* bezeichnete Schleife von TFIIB in der RNAP *Cleft* bis fast zum aktiven Zentrum fort und wieder zurück in Richtung RNA-Austrittskanal (Bushnell et al., 2004). Eine schwache Elektronendichte außerhalb der RNAP wurde als ein Teil des *Linkers* zwischen *B-Finger* und TFIIBc interpretiert (Abb. 3 b). Unter Berücksichtigung dieses *Linker*-Abschnittes wurde ein Modell für den PIC erstellt, in dem sich der TBP-TFIIBc-DNA-Komplex an der Rückseite der RNAP direkt oberhalb der *Dock*-Domäne befindet. Der *Linker* befindet sich außerhalb der DNA-bindenden Spalte.

Im Gegensatz dazu haben weitere Protein-Protein-*Crosslinking* Daten des Labors von Steven Hahn zu einem Modell geführt, welches den TFB-TFIIBc-DNA-Komplex oberhalb von *Cleft* und *Wall* positioniert (Chen und Hahn, 2004). Die DNA in diesem Model verläuft

wie bei den Bakterien parallel zur *Cleft*. Weitere *Crosslinking* Daten aus demselben Labor haben darüber hinaus gezeigt, dass TFIIE an der *Clamp* sitzt, während TFIIF auf der gegenüberliegenden Seite an *Protrusion* und *Lobe* gebunden ist (Chen et al., 2007).

Die Topologie des archaeellen Initiationskomplexes wurde ebenfalls über DNA-Protein *Crosslinks* erörtert (Bartlett et al., 2000; Vassilyev et al., 2002; Bartlett et al., 2004). Diese gehen konform mit beiden Modellen, zeigen also, dass die Gesamttopologie des archaeellen PICs sehr ähnlich zu dem der Eukaryoten ist. TFE bindet spezifisch an den nicht-kodogenen Strang und zwar vorwiegend 9 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstartes (Grünberg et al., 2007).

Röntgen-Kristallographie



Protein-Protein Crosslinking

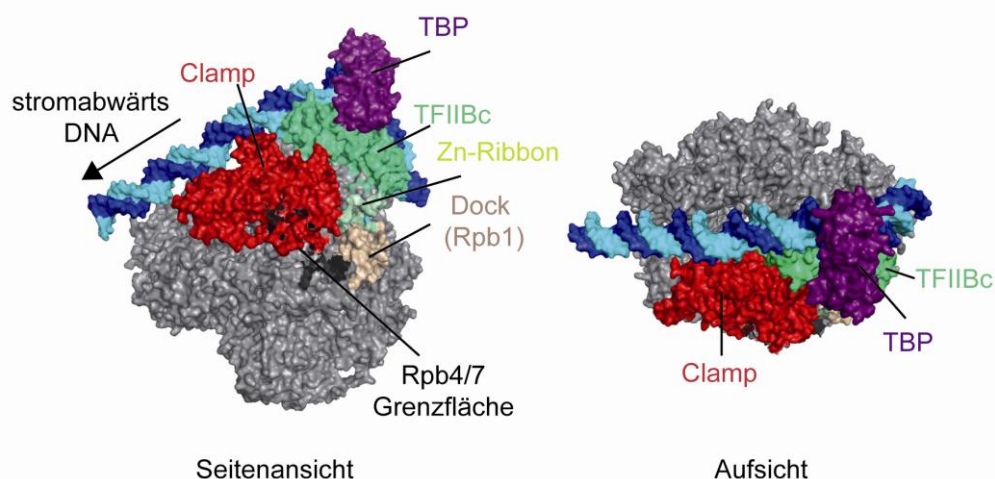


Abb. 4. Vergleich der PIC-Modelle von *S. cerevisiae* zu Beginn dieser Arbeit. Der Pol II-Core ist in den beiden Ansichten (links Seitenansicht, rechts Aufsicht) gleich ausgerichtet. Im auf Röntgen-Kristallographie basierten Modell sitzen TBP und der Core von TF(II)B (TFIIBc) unterhalb der *Dock* Domäne auf der RNAP Hinterseite, die DNA verläuft versetzt zur *Cleft* auf der *Clamp* schräg nach oben. Die Abbildung wurde aus (Bushnell et al., 2004) modifiziert. Im auf *Crosslinking* Daten basierten Modell sitzt der TBP-TFIIBc-Komplex oberhalb von *Wall* und die DNA verläuft parallel und oberhalb der *Cleft* (Chen und Hahn, 2004). Die Abbildung wurde mit dem vom auf der Homepage des Labors von Steven Hahn (<http://labs.fhcrc.org/hahn/index.html>) zur Verfügung gestellten PIC-Modell in PyMOL erstellt.

6. Bestimmung des Transkriptionsstartes

Archaeelle Promotoren ähneln in ihrem Aufbau dem von Eukaryoten (Abb. 5). Sie bestehen aus einer TATA-Box, dem flankierenden B-recognition Element (BRE) sowie dem Transkriptionsstart oder Initiator (Bartlett, 2005). Für *S. shibatae* sind 6 bp stromaufwärts und 4-5 bp stromabwärts der TATA-box wichtig für die Transkriptionseffizienz (Qureshi und Jackson, 1998). Der Transkriptionsstart (+1) wird durch den Abstand von der TATA-Box bestimmt und kann in einem Bereich von zirka 5 Nukleotiden variieren (Hausner et al., 1991). Der exakte Startpunkt wird durch die DNA-Sequenz, genauer über ein Pyrimidin-Purin Basenpaar an Position -1 und +1, festgelegt (Bartlett, 2005). Darüber hinaus hat die nicht konservierte Sequenz 10 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes einen Einfluss auf die Initiationseffizienz (*Promoter Proximal Element*, PPE) (Reiter et al., 1988; Thomm und Wich, 1988). Der Abschnitt entspricht der Transkriptionsblase im offenen Initiationskomplex, der GC-Gehalt des PPE könnte daher ausschlaggebend die Effizienz des DNA-Aufschmelzens beeinflussen (Hain et al., 1992). In einem Vergleich von über 100 *in vivo* kartierten Transkriptionsstarts von *M. jannaschii* wurde gezeigt, dass es sich um einen AT-reichen Sequenzbereich handelt (Zhang et al., 2009).

Im Gegensatz zur archaeellen RNAP verwendet Pol II von *S. cerevisiae* oft mehrere Startstellen in einem Abstand von 40 bis 120 bp zur TATA-Box (Giardina und Lis, 1993; Kuehner und Brow, 2006). Das Aufschmelzen an Hefepromotoren beginnt etwa 20 bp stromabwärts der TATA-box. Es wurde vorgeschlagen, dass die Startstellen-Selektion über einen *Scanning*-Mechanismus erfolgt, in dem die RNAP nach Promotoröffnung die stromabwärts DNA nach einem geeigneten Startpunkt „ausliest“ (Giardina und Lis, 1993). Wahrscheinlich geschieht dies über einen DNA-*Scrunching*-Mechanismus (Kapanidis et al., 2006). Der Transkriptionsstart ist in Hefe ebenfalls durch ein Pyrimidin-Purin Basenpaar an den Positionen -1/+1 gekennzeichnet (Zhang und Dietrich, 2005; Kuehner und Brow, 2006). Die Sequenz, welche den Transkriptionsstart umgibt wird als Initiator bezeichnet. 5'SAGE (*5' end serial analysis of gene expression*) erlaubte die Ermittlung der Transkriptionsstarts von über 2000 Hefe-Genen und führte zur Initiator-Konsensussequenz A(A(reich))5NPYA(A/T)NN(A(reich))6 (Zhang und Dietrich, 2005). (Kuehner und Brow, 2006) zeigen in einer Studie des SNR14-Promotors (Gen der U4 snRNA), dass insbesondere die Positionen -8, -7, -1 und +1 wichtig für die akkurate Initiation *in vivo* sind. Vor allem an Position -8 und zu einem gewissen Ausmaß an Position -7 wirkt sich ein A stimulierend auf die Initiationseffizienz aus.

Austauschexperimente der Faktoren TFIIB, -E, -F und -H zwischen *in vitro* Transkriptionssystemen von *S. cerevisiae* und *S. pombe* zeigten, dass TFIIB mit der RNAP alleine für die Determination der Startstelle verantwortlich sind (Li et al., 1994). Eine Reihe an TFIIB-Mutationen welche hauptsächlich den *B-Finger* betreffen, sind bekannt dafür, eine stromabwärts Verschiebung der Startstellennutzung zu verursachen und gehen *in vivo* oft mit einem kältesensitiven Phänotyp einher (Pinto et al., 1994; Bangur et al., 1997; Pardee et

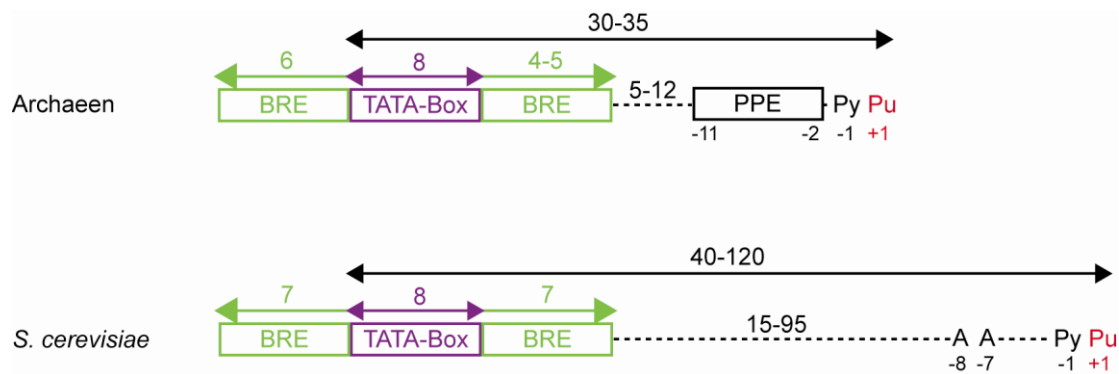


Abb. 5. Promotorarchitektur in Archaeen und *S. cerevisiae*. Archaeen initiieren in einem um etwa 5 bp variierbaren Abstand zur TATA-Box. Der Startpunkt (+1) ist durch ein Pyrimidin-Purin (PyPu) Basenpaar gekennzeichnet. *S. cerevisiae* hingegen kann in einem Fenster von etwa 40 bis 120 bp mit der Transkription - ebenfalls an PyPu - auch mehrmals beginnen. Das *B-recognition element* (BRE) beeinflusst die Initiationseffizienz. Die angegebenen Längen beruhen auf biochemischen Daten (Lagrange et al., 1998; Qureshi und Jackson, 1998). PPE, *Promoter Proximal Element*.

al., 1998; Cho und Buratowski, 1999; Faitar et al., 2001; Zhang et al., 2002). Entsprechende Mutationen im archaeellen TFB haben keine Startstellen-Verschiebung zur Folge (Bell und Jackson, 2000; Werner und Weinzierl, 2005; Santangelo et al., 2007; Kostrewa et al., 2009). Unabhängig von TFIIB können Mutationen in den eukaryotischen Faktoren Rpb9 (Hull et al., 1995; Sun et al., 1996) und TFIIF (Ghazy et al., 2004; Freire-Picos et al., 2005) die Nutzung stromaufwärts gelegener Startstellen favorisieren. Die gleichen Effekte konnten durch Mutationen in der RNAP, vornehmlich in *Lobe* und *Protrusion* erzielt werden (Hekmatpanah und Young, 1991; Chen und Hampsey, 2004). Interessanter Weise schwächen die RNAP Mutationen welche die Startstellenselektion beeinträchtigen die Interaktion mit TFIIF (Chen et al., 2007). Eine Deletion von Rpb9 führt außerdem zu einem TFIIF Bindungsdefekt von Pol II (Ziegler et al., 2003). Zwei unabhängige biochemische Arbeiten konnten mittlerweile Teile von TFIIF sehr genau auf *Protrusion* und *Lobe* modellieren, wobei sich eine physikalische Nähe zwischen TFIIF und Rpb9, sowie im PIC zwischen DNA und TFIIB ergibt (Chen et al., 2010; Eichner et al., 2010). TFIIB interagiert mit Rpb9 (Sun et al., 1996) und TFIIF liegt im PIC in räumlicher Nähe zum *B-Finger* (Chen und Hahn, 2004). Daher kann TFIIF wie TFIIB in die *Cleft* hin zum aktiven Zentrum ragen. Man kann spekulieren, dass das Interaktionsnetzwerk TFIIF-Rpb9-*Protrusion/Lobe* letztlich entweder über Stabilisierung der DNA in der *Cleft* oder durch Beeinflussung der Konformation von TFIIB auf die Startstellenselektion einwirkt.

Es ist bislang ungeklärt, weshalb *S. cerevisiae* vornehmlich über den *Scanning-Mechanismus* initiiert. Pol II von *S. pombe*, *Drosophila* und *H. sapiens* definieren den Transkriptionsstart ähnlich der archaeellen RNAP hauptsächlich über den Abstand (ca. 30 nt) zur TATA-Box (Smale und Kadonaga, 2003).

7. Struktur des Elongationskomplexes

Crosslinking-Experimente legten ursprünglich nahe, dass die DNA zwischen den Scherenhälften an den beiden *Jaw* Domänen in die *Cleft* eintritt (Korzheva et al., 2000; Wooddell und Burgess, 2000). Kristallstrukturen von Elongationskomplexen (ECs) der RNAP haben dies bestätigt (Cramer et al., 2000; Gnatt et al., 2001; Murakami et al., 2002). Das stromabwärts gelegene Ende der Transkriptionsblase liegt direkt vor der *Bridge-Helix*, einzelsträngige DNA windet sich über die *Bridge-Helix*, macht eine drastische Biegung, wobei die zur Basenpaarung benötigten Positionen Richtung aktives Zentrum gedreht werden und die Insertionsstelle (Register +1) bilden. Die mobile Schleife *Fork Loop 2* von Rpb2 ist wahrscheinlich am Entwinden des DNA-Doppelstranges am stromabwärts Ende der Transkriptionsblase beteiligt (Gnatt et al., 2001; Wang et al., 2006). Das 3'-Ende der RNA liegt direkt über der Pore am aktiven Zentrum, was zu der Annahme führt, dass der sekundäre Kanal der Zuleitung von Nukleotiden in das aktive Zentrum dient (Gnatt et al., 2001). Das 8-9 bp lange DNA-RNA-Hybrid windet sich in einem ca. 90° Winkel zur eintretenden DNA in Richtung *Wall/Flap* nach oben. Durch Schließen der *Clamp* und damit einhergehender Faltung von den 5 sogenannten *Switches* an deren Basis von *Cleft* und *Clamp* entsteht eine komplementäre Bindestelle für das DNA-RNA Hybrid. Die Bindung der Nukleinsäure wiederum stabilisiert die *Clamp* im geschlossenen Zustand (Abb. 6). Diese Wechselwirkung zwischen RNAP und Nukleinsäure bewirkt letztlich die Fähigkeit des Enzyms, an der Matrize gebunden zu bleiben und somit seine Prozessivität (Gnatt et al., 2001).

Der Verlauf des nicht-kodogenen DNA-Stranges in Pol II im Bereich der Transkriptionsblase konnte erst unlängst durch smFRET (*single-molecule fluorescence resonance energy transfer*) Analysen aufgeklärt werden (Andrecka et al., 2009). Die Blase ist geöffnet zwischen den Positionen -11 und +2 relativ zum Transkriptionsstart +1. Ausgehend vom

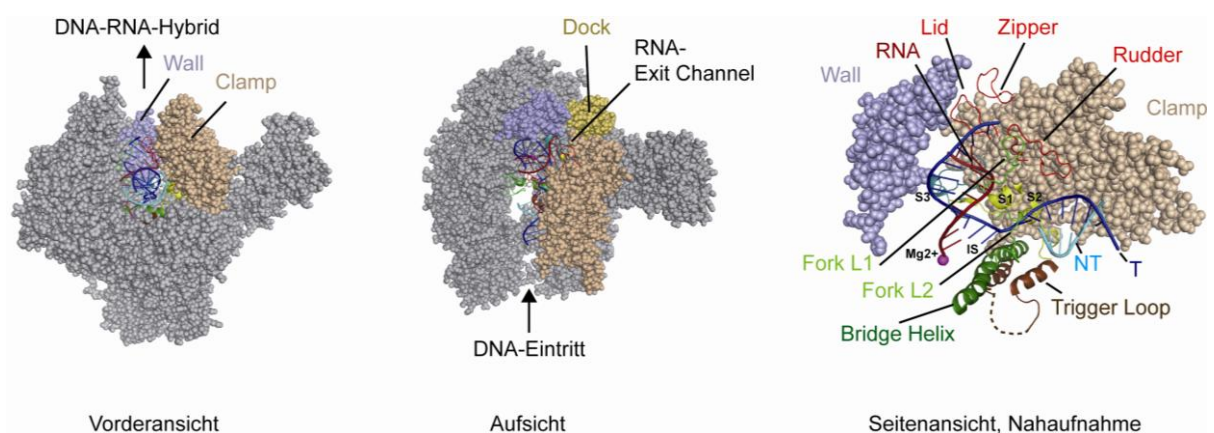
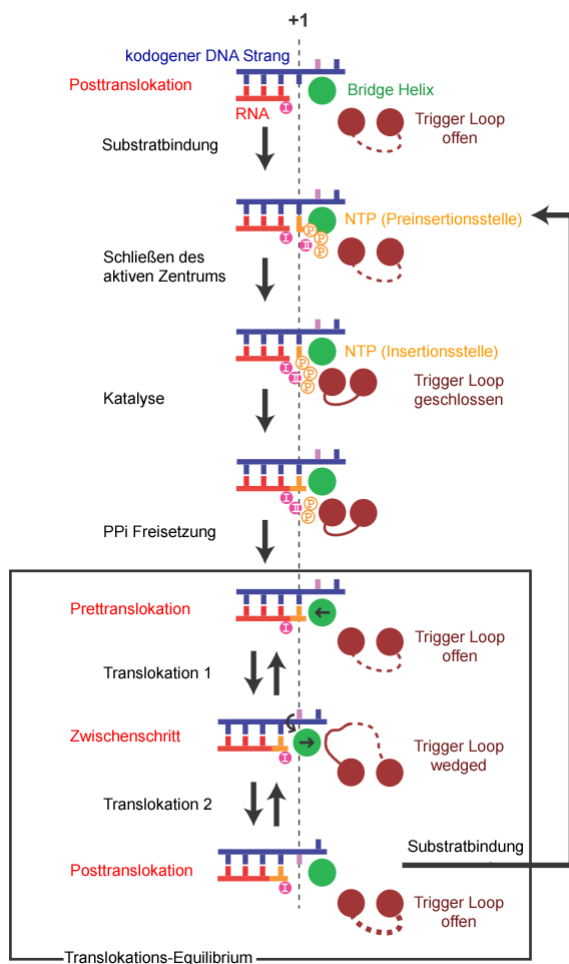


Abb. 6. Der Elongationskomplex. Nukleinsäuren, *Bridge Helix*, *Trigger Loop*, *Switches* (S1-S3) und *Cleft Loops* (*Lid*, *Zipper*, *Rudder*, *Fork Loops*) sind in *cartoon*-Darstellung, alle anderen Reste der RNAP in *spheres*-Darstellung (PyMOL, PDB 1Y1W, (Kettenberger et al., 2004)) gezeigt. S4 und S5 sind in dieser Ansicht nicht zu sehen. Mg2+, aktives Zentrum. Fork L, *Fork Loop*. IS, Insertionsstelle. T, *Template Strang*, NT, *Non-Template Strang*.

stromabwärts gelegenen Ende der Transkriptionsblase läuft der nicht-kodierende Strang vorbei an *Fork Loop 2*, auf der Rpb1-Seite der *Cleft* vorbei an der Spitze von *Lobe*, dann zur Rpb2-Seite der *Cleft*. Dort befinden sich die Positionen -7 bis -9 der DNA oberhalb von *Rudder* beziehungsweise nahe an *Fork Loop 1* (Position -10). Rehybridisierung von kodierendem mit nicht-kodierendem DNA-Strang erfolgt an *Zipper*, wobei die stromaufwärts gelegene DNA parallel zu $\alpha 8$ in der *Clamp* und $\alpha 11$ in *Protrusion* verläuft. *Crosslinking*-Experimente in Bakterien führten zu ähnlichen Ergebnissen (Korzheva et al., 2000; Naryshkin et al., 2000).

Ebenso konnte mit der smFRET-Methode der lange diskutierte Weg der RNA aus der RNAP bestimmt werden. Bei einer Länge von 10 Nukleotiden wird sie vom DNA-Template getrennt, tritt unterhalb von *Lid* in den RNA-Exit Tunnel, welcher an der Rückseite der RNAP liegt. Die austretende RNA bleibt an der RNAP Oberfläche im Bereich des RNA-Exit-Tunnels lokalisiert bis sie mit einer Länge von etwa 25 nt mit der *Dock*-Domäne interagiert. Ab einer Länge von 32 nt ist die RNA nur noch transient mit der RNAP assoziiert. Die Interaktion zwischen der *Dock* Domäne und RNA könnten für die endgültige Verdrängung von TFIIB aus dem PIC verantwortlich sein (Andrecka et al., 2008).

8. Mechanismus der RNA-Polymerisation



Das nun gängige Modell des Nukleotid-Additions-Zyklus (NAZ, Abb. 7) beruht auf der Beobachtung unterschiedlicher Konformationen des aktiven Zentrums. Am auffälligsten ist dabei die *Bridge Helix*, welche in gerader bis leicht gebogener (Cramer et al., 2001; Gnatt et al., 2001; Wang et al., 2006; Vassylyev et al., 2007; Hirata et al., 2008b), geknickter (Zhang et al., 1999; Vassylyev et al., 2002) oder intermediärer (Tuske et al., 2005; Brueckner und Cramer, 2008) Konformation erfasst wurde. In einem archaeellen Rekonstitutionssystem konnte gezeigt werden, dass das reversible Knicken

Abb. 7. Mechanismus der Elongation. Die Ansicht entspricht einem Längsschnitt durch die RNAP entlang der DNA-bindenden Spalte mit Blick in Richtung Rpb1. Die *Bridge Helix* ist durch einen grün gefüllten Kreis dargestellt. Rot gefüllte Kreise stellen die unbeweglichen, die rote unterbrochene Linie den beweglichen Abschnitt des *Trigger Loops* dar. Die Abbildung wurde leicht verändert aus (Brueckner und Cramer, 2008) übernommen. Details siehe Text.

tatsächlich wichtig für die Katalyse ist: werden in der geknickten *Bridge Helix* Konformation zwei putativ miteinander interagierende Reste mutiert, geht die Aktivität beinahe verloren, während eine Doppelmutante bei Wiederherstellung der Interaktion die Aktivität zurückerlangt (Tan et al., 2008).

Darüber hinaus zeigen Elongationskomplexe, dass der *Trigger Loop* abhängig von der *Bridge Helix* Konformation in einer offenen, geschlossenen, oder intermediären (*wedged*) Konformation vorliegt (Wang et al., 2006; Brueckner und Cramer, 2008; Kaplan et al., 2008). Diese Beobachtungen führten zu einem Modell für den NAZ, in dem der Einbau eines Nukleotides mit dem Öffnen und Schließen des *Trigger Loops* und der damit verbundenen Biegung der *Bridge Helix* einhergeht. Im Posttranslokationsstadium ist die Insertionsstelle unbesetzt, der *Trigger Loop* ist offen. NTPs binden zunächst in einer Preinsertionsstelle, bevor sie in die Initiationsstelle gebracht werden. Dies geht einher mit dem Schließen des *Trigger Loops* und des aktiven Zentrums, wonach die RNAP in ihrer katalytisch aktiven Konformation vorliegt. Das Inkorporieren des Nukleotids in die RNA entlässt ein Pyrophosphat (PPi). Nach Freisetzung von PPi bewegt sich der *Trigger Loops* in die offene Konformation, die *Bridge Helix* wird nach oben geknickt und der kodierende DNA-Strang dadurch ein Stück weiterbewegt. Im Zwischenschritt von Pre- zu Posttranslokation nimmt der *Trigger Loop* die *wedged* Konformation ein. Umwandlung des *Trigger Loops* in die geöffnete Form und die einhergehende Entspannung der *Bridge Helix* in die gerade Konformation vervollständigen die DNA-Bewegung über die *Bridge Helix* um eine Position, so dass die nächste zu kopierende Base in der Insertionsstelle zugänglich wird (Brueckner et al., 2009). Eine Reihe an Untersuchungen der bakteriellen und eukaryotischen Enzyme zeigen, dass die RNAP nach Inkorporieren des Nukleotides zwischen Pre- und Posttranslokation oszilliert, bis das nächste NTP die Insertionsstelle erreicht. In diesem Sinne wurde die RNAP mit einer Brownschen Ratsche verglichen, wobei die Nukleotide die Bewegungsrichtung vorgeben und damit dem Sperrzahn entsprechen (Landick, 2004; Barnahum et al., 2005; Sousa, 2005).

9. Proofreading

Die geschätzte Fehlerrate bakterieller (Blank et al., 1986) und eukaryotischer RNAPs (de Mercoyrol et al., 1992) beträgt weniger als 1 in 10^5 und ist damit gegenüber der Fehlerrate der Translation gering. Kommt es dennoch zum Falscheinbau eines Nukleotides, pausiert die RNAP, und es kommt unter Umständen zu Transkriptionsarrest und Rückwärtsbewegung der RNAP (*Backtracking*) (Sydow und Cramer, 2009). DNA-Schäden können ebenfalls zu Transkriptionsarrest (Donahue et al., 1994; Brueckner et al., 2007; Damsma et al., 2007) führen. Bei *Backtracking* bewegt sich die RNAP entgegengesetzt zur Transkriptionsrichtung am *Template*-Strang, wobei sich das 3'-Ende der RNA vom aktiven Zentrum löst (Reeder und Hawley, 1996; Komissarova und Kashlev, 1997) und vermutlich in die Pore der RNAP gedrückt wird (Sydow und Cramer, 2009).

Um den Falscheinbau zu eliminieren, induzieren der eukaryotische Transkriptionsfaktor TFIIS (Wind und Reines, 2000) bzw. das archaeelle homolog TFS (Hausner et al., 2000) und die bakteriellen Faktoren GreA und GreB (Fish und Kane, 2002) eine Spaltungsreaktion der RNA. Es wird dadurch ein neues RNA-3'-Ende kreiert, an dem die Elongation fortgesetzt werden kann (Abb. 8). Im Wesentlichen stellt die RNA-Spaltung die Rückwärtsreaktion der RNA-Polymerisation dar, wobei ein 2-Schritt-Mechanismus angenommen wird, bei dem ein Wassermolekül anstelle von PPi den nukleophilen S_N2 -Angriff übernimmt (Kettenberger et al., 2003).

Für Pol II wurde gezeigt, dass sowohl die Fehleinbaueffizienz als auch die Elongationsrate nach dem Fehleinbau von der Art der Basenfehlpaarung abhängt. Purin-Purin Basenpaare werden mit der geringsten Effizienz inkorporiert, werden aber auch am effizientesten verlängert. RNAs mit effizient verlängerte Fehlpaarungen werden effizient durch TFIIS vermittelte Spaltung geschnitten (Sydow et al., 2009). TFIIS von *S. cerevisiae* spaltet fehlgepaarte Nukleotide schneller als korrekt gepaarte RNA (Wang et al., 2009). In einer Studie über die RNA-Spaltungsfunktion von archaeellem TFS aus *Methanococcus thermolithotrophicus* wurden vornehmlich Dinukleotide (Hausner et al., 2000) freigesetzt, wie

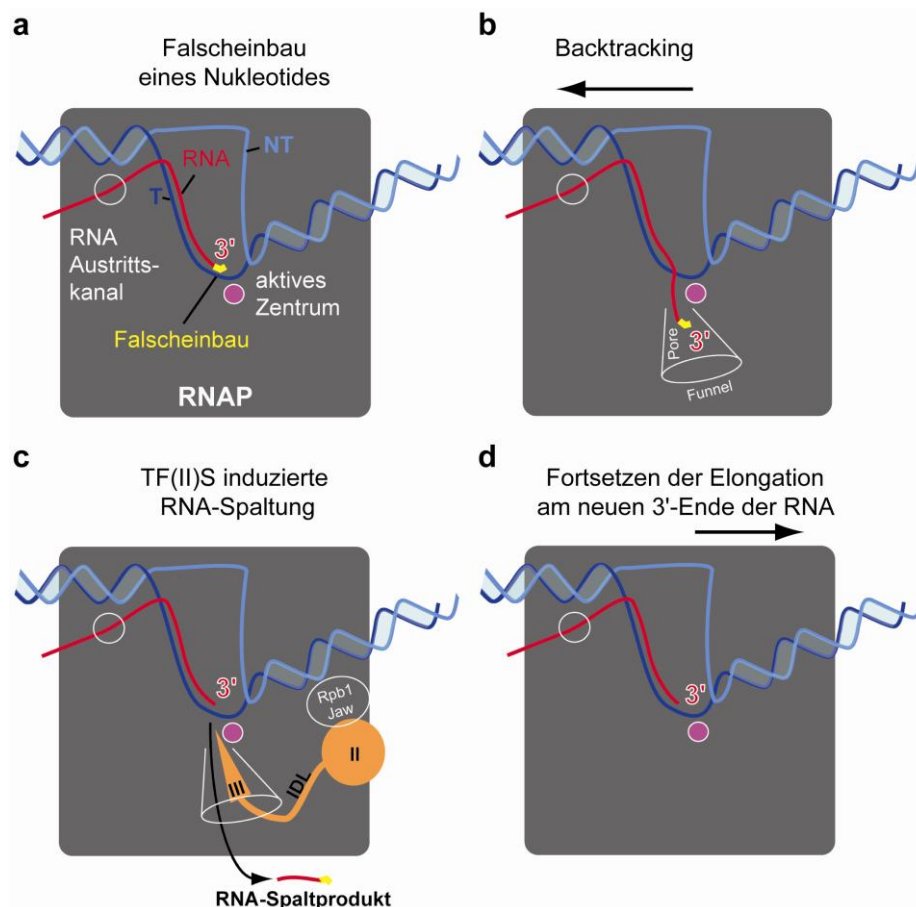


Abb. 8. Backtracking. Kommt es zum Einbau eines falschen Nukleotids am wachsenden 3'-Ende der RNA pausiert die RNAP, das terminale RNA-Nukleotid löst sich vom aktiven Zentrum und Template DNA-Strang. Nach dem derzeitigen Modell wird das 3'-Ende der RNA in die Pore gedrückt (Backtracking), was mit dem Arretieren der Elongation einhergehen kann. Durch TF(II)S induzierte RNA-Spaltung kann die Elongation fortgesetzt werden. Details siehe Text.

dies auch für eukaryotische und bakterielle RNAPs zutrifft (Sydow und Cramer, 2009). Ausgeprägtes *Backtracking* konnte über KMnO₄- sowie Exonuklease III- Footprints mit der archaeellen RNAP nicht nachgewiesen werden (Spitalny und Thomm, 2003; Lange und Hausner, 2004).

Im Gegensatz zu Pol II besitzen Pol I (Kuhn et al., 2007) und III (Chedin et al., 1998; Alic et al., 2007) eine sehr ausgeprägte intrinsische *Proofreading*-Aktivität, die von den TFIIS Homologen A12.2 bzw. C11 abhängt. Der ebenfalls zu TFIIS homologen Pol II Untereinheit Rpb9 fehlt die katalytische Domäne, jedoch ist Rpb9 ebenso wie TFIIS für die *Proofreading*-Aktivität von Pol II *in vivo* notwendig (Nesser et al., 2006; Koyama et al., 2007). Die archaeelle *M. thermolithotrophicus* RNAP besitzt eine schwache intrinsische RNA-Spaltungsaktivität (Hausner et al., 2000). TFIIS wurde lange Zeit als Pol II Elongationsfaktor angesehen. Neuere Daten zeigen jedoch, dass TFIIS bereits mit dem Pol II Initiationskomplex assoziiert (Prather et al., 2005; Guglielmi et al., 2007; Kim et al., 2007). Darüber hinaus interagiert TFIIS mit Pol I und induziert wie bei Pol II RNA-Spaltung (Schnapp et al., 1996). ChIP-on-Chip Analysen von TFIIS haben außerdem gezeigt, dass TFIIS mit Pol III Genen assoziiert (Ghavi-Helm et al., 2008).

Die Struktur von TFIIS wurde ursprünglich über limitierende Proteolyse und NMR partiell gelöst. Basierend auf deren Ergebnisse wurde TFIIS in drei Domänen (I, II und III) unterteilt (Morin et al., 1996; Olmsted et al., 1998). Von der N-terminalen Domäne I ist bis heute keine Struktur bekannt. Sie ist für die Lebensfähigkeit von Hefe nicht essentiell. Für die Assemblierung von TFIIS in Initiationskomplexen sind Domäne I und Domäne II, nicht jedoch Domäne III notwendig (Kim et al., 2007).

Röntgenkristallstrukturen der Pol II mit TFIIS von Hefe zeigen, dass Domäne II an der Unterseite der Rpb1 *Jaw*-Domäne andockt, der α -helikale *Interdomain-Linker* zu Domäne III an der Außenseite der RNAP zu *Funnel* hin verläuft, Domäne III in der Pore sitzt und bis an das aktive Zentrum heranreicht (Kettenberger et al., 2003) (Abb. 9a und 9b). Damit entspricht die Position von TFIIS trotz fehlender Sequenz- und Strukturhomologie dem bakteriellen GreB-Protein (Polyakov et al., 1998; Opalka et al., 2003). Die C-terminalen Domänen III und II sind unter den Eukaryoten sehr konserviert, in Archaeen insbesondere auch Domäne III (Hausner et al., 2000) (Abb. 9c). Letztere reicht mit einem β -*hairpin loop*, welcher 2 für die Katalyse essentielle saure Aminosäuren besitzt (Jeon et al., 1994), bis ins aktive Zentrum.

Kürzlich konnten EC-Komplexe mit einer oder mehreren Basenfehlpaarungen kristallisiert werden. Bei Nicht-Watson-Crick Paarung (*Wobble*-Basenpaarung) an Position -1, nimmt das 3'-terminale Nukleotid je nach Base eine von zwei alternativen Positionen (*fraying sites I* und *II*) ein. Das Nukleotid ist ausgefranst (*frayed*), das heißt es dreht sich vom DNA-Template weg in Richtung Pore (Sydow et al., 2009). Die Existenz einer *fray-site* wurde zuvor aufgrund von *Crosslinking* Daten in Bakterien postuliert und wird typischer Weise bei Pausieren der Transkription besetzt (Artsimovitch und Landick, 2000; Touloukhonov et al., 2007).

In einer anderen Arbeit ist es gelungen, die Strukturen von Komplexen die *Backtracking* unterworfen waren, mit 1, 2 oder mehreren nicht-paarenden Nukleotiden am 3' Ende der RNA zu lösen (Wang et al., 2009). Interessanter Weise nimmt die erste ungepaarte Base stets eine genau definiert Position oberhalb der *Bridge Helix* ein (*Proofreading-* oder *P-site*), welche mit der *fray site II* überlappt, wobei das terminale Nukleotid aber nicht von der *Template*-Base

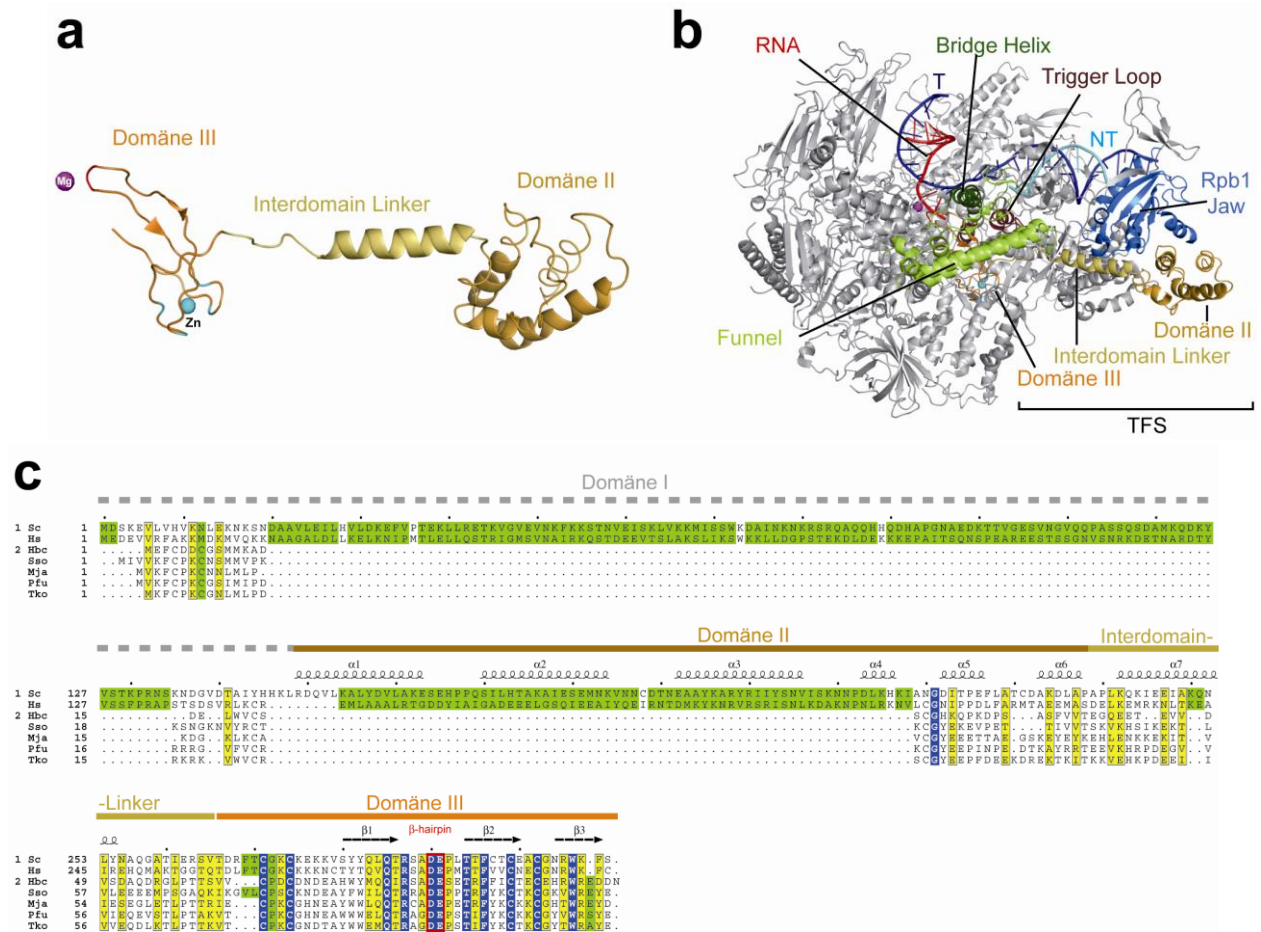


Abb. 9. Transkriptionsfaktor (II)S. (a) Domänenstruktur von TFIIS von *S. cerevisiae*. Domäne III beinhaltet zwei für die Funktion essentielle saure Aminosäuren (rot) an der Spitze des β -hairpins (rot), welche in der Nähe des aktiven Zentrums (Mg) gelegen sind. In der ebenfalls konservierten *Zn-Ribbon* Struktur wird das Zinkion (Zn, cyan) von 4 Cysteinen komplexiert (cyan). (b) TFIIS im Kontext des Elongationskomplexes (PDB 3GTM, (Wang et al., 2009)), Seitenansicht. Von Rpb2 ist nur der C-terminale Teil ab *Wall* gezeigt, um den Blick auf das aktive Zentrum freizugeben. TFIIS Domäne II bindet unterhalb der Rpb1 *Jaw* Domäne (blau), der *Interdomain-Linker* verläuft bis zu *Funnel* (hellgrün), Domäne III inseriert in der Pore. T, *Template* Strang. NT, *Non-Template* Strang. (c) Sequenzalignment von eukaryotischem TFIIS und archaeellem TFS (erstellt mit MUSCLE (Edgar, 2004), Darstellung mittels ESPRIPT (Gouet et al., 1999)). Domänen I und II sind in Archaeen stark verkürzt, *Interdomain-Linker* und Domäne III sind konserviert. Identische Aminosäuren sind blau, ähnliche Reste gelb gekennzeichnet. Eukaryotische und archaeelle Sequenzen wurden gruppiert, konservierte Reste innerhalb der Gruppe sind grün unterlegt. Oberhalb der Sequenz sind Sekundärstrukturen entsprechend der TFIIS Struktur von *S. cerevisiae* eingezeichnet. Die blauen Sterne zeigen die konservierten Cysteine des *Zn-Ribbons*. Die katalytischen Reste (Asparat und Glutamat) sind mit einem roten Kasten umrahmt. Sc, *S. cerevisiae*. Hs, *Homo sapiens* TFIIS1. Hbc, *Halobacterium* sp. NRC-1. Sso, *Sulfolobus solfataricus*. Mja, *Methanocaldococcus jannaschii*. Pfu, *Pyrococcus furiosus*. Tko, *Thermococcus kodakaraensis*.

weggedreht ist. Erst bei einem 3'-Überhang von sieben RNA-Nukleotiden werden zusätzliche vier Nukleotidpositionen im Kristall erkennbar. EC-Komplexe, die *Backtracking* um 1 Nukleotid unterworfen sind, nehmen demnach einen energetisch stabilen Zustand ein. *Backtracking* um mehr als ein Nukleotid bringt erst dann wieder einen Energiegewinn mit sich, wenn die Rückwärtsbewegung beträchtlich ist, weil dann zusätzliche Kontakte von der RNAP zur RNA hergestellt werden können.

Kristallstruktur-Analysen funktionell inaktiver TFIIS Mutanten mit Hefe Pol II und ECs zeigen eine Umstrukturierung des aktiven Zentrums mit teilweise beträchtlichen Verschiebungen der Positionen der RNA bzw. des DNA-RNA Hybrides (Kettenberger et al., 2003; Kettenberger et al., 2004). Die Veränderung des aktiven Zentrums verhindert eine Überlappung des β -*hairpin loops* von TFIIS mit der Nukleotid-Bindestelle und/oder dem *Trigger Loop*. Der *Trigger Loop* spielt eine zentrale Rolle für die Selektion des basenpaarenden NTPs und die Diskriminierung zwischen Ribo- und Deoxyribonukleotiden (Wang et al., 2006; Kaplan et al., 2008). Bei *Backtracking* um ein oder zwei Nukleotide liegt der *Trigger Loop* in der *wedged* Konformation vor. Wenn in diesen Komplexen zusätzlich TFIIS vorhanden ist, oder bei *Backtracking* um mehr als zwei Nukleotide, oder wenn kein *Backtracking* auftritt, nimmt der *Trigger Loop* die offene Konformation ein. Dies wiederum verstärkt die Annahme, dass die RNAP bei *Backtracking* um ein bis zwei Nukleotide eine eigenständige und stabile Konformation einnimmt (Wang et al., 2009).

II) Material

A) Bezugsquellen

1. Chemikalien

Acrylamid, 2x	Serva, Heidelberg
Agarose NEEO Ultra	Roth, Karlsruhe
Ampizillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Oxoid Ltd, Cambridge, UK
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit USA
Bacto Pepton	Difco, Detroit USA
Bacto Trypton	Difco, Detroit USA
Bis-Acrylamide, 2x	Serva, Heidelberg
Bis-Tris	Merck, Darmstadt
Blue Slick (Repellent)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CSM-Leu-Trp	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
DC-AF Keisegel 60 F ₂₅₄	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
DNA ladders	MBI Fermentas, Wilna Litauen
dIC (poly 2'-deoxyinosinic-2'-deoxycytidylic acid)	Fluka, St. Gallen, Schweiz
dNTPs	MBI Fermentas, Wilna Litauen
Dynabeads M280 Streptavidin (Dyna)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
5-FOA (5-fluoroorotic acid monohydrate)	Toronto Research Chemicals, Kanada
Formamid	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glykogen	Roche, Mannheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
GpU	Sigma-Aldrich, Seelze
Guanidine HCl	Sigma-Aldrich, Seelze
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Sigma-Aldrich, Seelze
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isotope: [α - ³² P]-ATP, [α - ³² P]-UTP	Hartmann Analytik, Braunschweig
Kaliumpermanganat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid MgCl ₂	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid NaCl	AnalaR NORMAPUR, VWR Darmstadt

Natriumhydroxid NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat Na ₂ S ₂ O ₃	Fluka, St. Gallen, Schweiz
Natriumcarbonat Na ₂ CO ₃	Roth, Karlsruhe
Ni-NTA Magnetic Agarose Beads	Qiagen, Hilden
NTPs	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)	Roth, Karlsruhe
Piperidin	Fluka, St. Gallen, Schweiz
Protease Inhibitor Cocktail (Complete, Mini)	Roche, Mannheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth, Karlsruhe
PVDF- (Polyvinylidenfluorid-) Western Blotting Membran	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) oder 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylphosphat)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Streptavidin Magnet-Partikel	Roche, Mannheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Roth, Karlsruhe
Tricin (<i>N</i> -(<u>Tri</u> (hydroxymethyl)methyl)glycin)	Merck, Darmstadt
Tris	USB, Cleveland, USA
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Seelze
Tween-20	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Uracil	Sigma-Aldrich, Seelze
Whatman Papier	GE healthcare, Chalfont St Giles, UK
Xylencyanol FF	Roth, Karlsruhe
YNB (yeast nitrogen base) + Ammoniumsulfat	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Zinkchlorid ZnCl ₂	Merck, Darmstadt

2. Säulenchromatographie

FPLC System

ÄKTA purifier 12

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

Affinitätsreinigung

NiNTA-Säule: HiTrap Chelating HP 5 ml

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

Ionenaustausch Chromatographie

HiPrep 16/10 Heparin FF

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

Biorex 70 Resin

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

MonoQ 5/50 GL

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

HiTrap SP HP 5 ml

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

MonoS HR 5/5

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

Gelfiltration

Superdex 200 10/300 GL

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

HiLoad 16/60 Superdex 75

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

Superose 6 10/300 GL

GE healthcare, Chalfont St Giles, UK

3. Enzyme und andere Proteine

Taq DNA-Polymerase

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

Phusion High Fidelity DNA-Polymerase

Finnzymes, Espoo, Finnland

Proof DNA-Polymerase

Segetic, Borken

Pfu DNA-Polymerase native/recombinant

MBI Fermentas, Wilna, Litauen

H-Minus MMuLV Reverse Transcriptase

Sigma-Aldrich, Seelze

T4 Polynukleotidkinase (PNK)

New England Biolabs, Ipswich, USA

λ -Exonuklease
 DNaseI, RNase free
EcoRI, *DpnI*
NotI, *Sall*, *XbaI*, *XhoI*, *DpnI*
 Proteinstandards (#SM0661, #SM0671)
 BSA (special quality for molecular biology)
 Zymoloyase 100T
 Kreatinphosphokinase

MBI Fermentas, Wilna, Litauen
 Roche, Mannheim
 New England Biolabs, Ipswich, USA
 MBI Fermentas, Wilna, Litauen
 MBI Fermentas, Wilna, Litauen
 Roche, Mannheim
 Seikagaku, Tokyo, Japan
 Sigma-Aldrich, Seelze

4. Kits

QIAquick PCR Purification Kit
 QIAprep Spin Miniprep Kit
 QIAprep Maxiprep Kit
 QIAquick Gel Extraction Kit
 QIAquick Nucleotide Removal Kit
 Quick Change II
 Quick Ligation Kit
 Champion pET Directional TOPO Expression Kit

Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Stratagene, La Jolla, USA
 New England Biolabs, Ipswich, USA
 Invitrogen, Karlsruhe

5. Stämme

Pyrococcus furiosus DSM3638

Escherichia coli, JM109
Escherichia coli, XL1
Escherichia coli, DH5 α
Escherichia coli, BL21(DE3)Codon Plus-RIL
Escherichia coli, BL21(DE3)pLysS

Saccharomyces cerevisiae BY4743 (YSC1021-99330746: diploid knockout of SUA7 (TFIIB))
Genotyp: MATa/MAT α , his3 delta1/his3 delta,
 leu2 delta0/leu2 delta0, lys2 delta0/+, met15
 delta0/+, ura3 delta0/ura3 delta0, **delta SUA7**.

Fiala and Stetter, 1986

 Yanisch-Peron et al., 1985
 Stratagene, La Jolla, USA
 Taylor et al., 1993
 Stratagene, La Jolla, USA
 Stratagene, La Jolla, USA

 Open Biosystems

Saccharomyces cerevisiae SHY245 (TFIIB-G31E)

Ranish et al., 1999

Tab. 1. Hefestämme dieser Arbeit

Stamm	Ursprung	Vektoren
AM 1	BY4743 delta SUA 7	
AM 7	Tetraden AM1	pRS316-TFIIBwt
AM 8	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-N68A
AM 9	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-N68Q
AM 10	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-R78C
AM 11	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-V79L
AM 12	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-L110A
AM 13	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-L110P
AM 14	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-G165Q
AM 18	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-TFIIB-wt
AM 8 S	AM 8	pRS315-N68A
AM 9 S	AM 9	pRS315-N68Q
AM 10 S	AM 10	pRS315-R78C

Fortsetzung Tab. 1

AM 11 S	AM 11	pRS315-V79L
AM 12 S	AM 12	pRS315-L110A
AM 13 S	AM 13	pRS315-L110P
AM 14 S	AM 14	pRS315-G165Q
AM 18 S	AM 18	pRS315-TFIIB-wt
MZ 1	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS 315-dRC
MZ 2	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS 315-dRT
MZ 3	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS 315-RTA
MZ 4	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS 315-dLS
MZ 5	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS 315-LSA
MZ 6	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS 315-dLH
MZ 7	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-E62R
MZ 8	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-R64E
MZ 9	AM 7	pRS316-TFIIBwt und pRS315-F66D
MZ 1 S	MZ 1	pRS315-dRC
MZ 2 S	MZ 2	pRS315-dRT
MZ 3 S	MZ 3	pRS315-RTA
MZ 4 S	MZ 4	pRS315-dLS
MZ 5 S	MZ 5	pRS315-LSA
MZ 6 S	MZ 6	pRS315-dLH
MZ 7 S	MZ 7	pRS315-E62R
MZ 8 S	MZ 8	pRS315-R64E
MZ 9 S	MZ 9	pRS315-F66D

6. Sequenzierung

Geneart (Regensburg), MWG (Ebersburg), Entelechon (Regensburg) oder Seqlab (Göttingen).

B) Plasmide

pET151/D-TOPO-B	<i>Dissertation Suad Naji</i>
pET151/D-TOPO-A'	<i>Dissertation Suad Naji</i>
pET151/D-TOPO-A''	<i>Dissertation Suad Naji</i>
pET151/D-TOPO-B- Δ flap [Δ (L817-Q828)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'-R247E	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'-D267R	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'-L271A	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'-Y274E	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'-A260R	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'-Y388A	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'-R388E	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'-V827A	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'- Δ zipper [Δ (T31-E40)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A'- Δ dock [Δ (V352-R411)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A''-L83A	<i>Diese Arbeit</i>
pET151/D-TOPO-A''-P101A	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB	<i>Dissertation Bernd Goede</i>
pET14-TFB- Δ b-finger [Δ (E43-E62)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-zn-ribbon [C26S, C29S]	<i>Diese Arbeit</i>

pET14-TFB- Δ readerloop [Δ R55-A60)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-R45A	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-R45E	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-A49N	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-R57A	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-R57E	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-R79D	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-R86D	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-K88E	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-L92A	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-L92P	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-R93D	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB- Δ readerturn [Δ (E62-H67)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-readerturnAla [I64A,L65A,L66A)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB- Δ linkerstrand [Δ (L71-I75)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB-linkerstrandAla [L71A,S72A,T73A,I75A]	<i>Diese Arbeit</i>
pET14-TFB- Δ linkerhelix [Δ (M85-W95)]	<i>Diese Arbeit</i>
pRS316-TFIIBwt	<i>Kerstin Meier, Labor P. Cramer</i>
pRS315-TFIIBwt	<i>Kerstin Meier, Labor P. Cramer</i>
pRS315-TFIIB-E62R	<i>Diese Arbeit</i>
pRS315-TFIIB-R64E	<i>Diese Arbeit</i>
pRS315-TFIIB-F66D	<i>Diese Arbeit</i>
pRS315-TFIIB-N68A	<i>Kerstin Meier, Labor P. Cramer</i>
pRS315-TFIIB-N68Q	<i>Kerstin Meier, Labor P. Cramer</i>
pRS315-TFIIB-R78C	<i>Kerstin Meier, Labor P. Cramer</i>
pRS315-TFIIB-V79L	<i>Kerstin Meier, Labor P. Cramer</i>
pRS315-TFIIB-L110A	<i>Kerstin Meier, Labor P. Cramer</i>
pRS315-TFIIB-L110P	<i>Kerstin Meier, Labor P. Cramer</i>
pRS315-TFIIB- Δ readerloop [Δ (P76-E81)]	<i>Diese Arbeit</i>
pRS315-TFIIB- Δ readerturn [Δ (S83-D88)]	<i>Diese Arbeit</i>
pRS315-TFIIB-readerturnAla [P85A,L86A,L87A]	<i>Diese Arbeit</i>
pRS315-TFIIB- Δ linkerstrand [Δ (L92-I96)]	<i>Diese Arbeit</i>
pRS315-TFIIB-linkerstrandAla [L92A,S93A,T94A,I96A]	<i>Diese Arbeit</i>
pRS315-TFIIB- Δ linkerhelix [Δ M104-Q114)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIBwt	<i>Anass Jawhari, Labor P. Cramer</i>
pET30-TFIIB-E62R	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB-R64E	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB-F66D	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB-N68A	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB-R78C	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB-V79L	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB-L110P	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB- Δ readerloop [Δ (P76-E81)]	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB-linkerstrandAla [L92A,S93A,T94A,I96A]	<i>Diese Arbeit</i>
pET30-TFIIB- Δ linkerhelix [Δ (M104-Q114)]	<i>Diese Arbeit</i>
pUC19-gdhC20	<i>Spitalny und Thomm, 2003</i>
pSH515	<i>Ranish et al., 1999</i>
pMSe24	<i>Kostrewa et al., 2009</i>

C) Primer für die Proteinmutagenese

B-Fw	CACCATGAGAGGTCCGACTG
B-Rv	TCACACCTCTCTGAGAGGTTTAAC
B- <i>Δflap</i> -L	CTCTCTTCTCTCGAACCTTGGTGGAGAAGTTCTTCC
B- <i>Δflap</i> -R	CACCAAGGTTTCGAGAGAAGAGAGACTAGTGTGGCTGTAAGG
A'-Fw	CACCATGAAAAAAGTTATTGGAAGTATTG
A'-Rv	TCACACCTTCGCCTTGTTATTTTC
A'-R247E-Fw	GACTTAACTCATAAACTTGTTGACATAATAGAGATAAATAACAGGCTAAAGCAGAATATAGA
A'-R247E-Rv	TCTATATTCTGCTTTAGCCTGTTATTTATCTCTATTATGTCAACAAGTTTATGAGTTAAGTC
A'-D267R-Fw	AGCTCCTCAGTTGATTATTGAGAGGCTCTGGGATCTCTTGCAGTATC
A'-D267R-Rv	GATACTGCAAGAGATCCCAGAGCCTCTCAATAATCAACTGAGGAGCT
A'-L271A-Fw	ATTATTGAGGATCTCTGGGATGCCTTGCACTATCACGTTACAAC
A'-L271A-Rv	GTTGTAACGTGATACTGCAAGGCATCCCAGAGATCCTCAATAAT
A'-Y274E-Fw	GGATCTCTGGGATCTCTTGCAGGCTCACGTTACAACCTACATTAAC
A'-Y274E-Rv	GTTAATGTAAGTTGTAACGTGAGCCTGCAAGAGATCCCAGAGATCC
A'-A260R-Fw	GCTAAAGCAGAATATAGAAGCTGGACGTCCTCAGTTGATTATTGAG
A'-A260R-Rv	CTCAATAATCAACTGAGGACGTCCTCAGCTTCTATATTCTGCTTTAGC
A'-Y380A-Fw	AATATCCCGGAGCTAACGCCGTGATAGACCCCGAGG
A'-Y380A-Rv	CCTCGGGGTCTATCACGGCGTTAGCTCCGGGATATT
A'-R388E-Fw	GATAGACCCCGAGGCTAGAGAAAGGAGAATCATGGATAGC
A'-R388E-Rv	GCTATCCATGATTCTCCTTTCTCTACCTCGGGGTCTATC
A'-V827A-Fw	GGTAGAGAGGGTCTCGCAGATACCGCAGTTAGA
A'-V827A-Rv	TCTAACTGCGGTATCTGCGAGACCTCTCTACC
A'- <i>Δzipper</i> -Fw	CATTACTCCGCCATCTGGTACTGTGACTTCCACAGC
A'- <i>Δzipper</i> -Rv	CAGTACCAGATGGCGGAGTAATGGACAAAAGAATG
A'- <i>Δdock</i> -L	CCATTAGATGTGTTAATTCCATTGCGACTTCAACT
A'- <i>Δdock</i> -R	GGAATTAACACATCTAATGGATGGAGATATAGTGCTGTTTTAAC
A''-L83A-Fw	ACCTTCAACCCAGATGACTGCCAACACTTTCCACTATGCA
A''-L83A-Rv	TGCATAGTGGAAAGTGTTGGCAGTCATCTGGGTTGAAGGT
A''-P101A-Fw	GAAATTAACGTTACTTTAGGTTTGGCAAGAATTATAGAAATCGTGGATG
A''-P101A-Rv	CATCCACGATTTCTATAATTCTTGCCAAACCTAAAGTAACGTTAATTTTC
TFB-znribbon-Fw	GAGAGGGGGGAAATAGTCTCTGCCAAGTCCGGTTATGTAA
TFB-znribbon-Rv	TTACATAACCGGACTTGGCAGAGACTATTTCCCCCTCTC
TFB- <i>ΔreaderC</i> -Fw	TGCTTCTCAAAGGGAACGCCAGAAAGTATTCTTCTTC
TFB- <i>ΔreaderC</i> -Rv	GAAGAAGAATACTTTCTGGGCGTTCCCTTTGAGAAGCA
TFB-R45A-Fw	GATATGGGTCTGAGTGGGCTGCTTTTGATGCTTCTCA
TFB-R45A-Rv	TGAGAAGCATCAAAAGCAGCCCACTCAGGACCCATATC
TFB-R45E-Fw	ATTGATATGGGTCTGAGTGGGAAGCTTTTGATGCTTCTCAAAGG
TFB-R45E-Rv	CCTTTGAGAAGCATCAAAAGCTTCCCACTCAGGACCCATATCAAT
TFB-A49N-Fw	GGGTCTGAGTGGCGTGCTTTTGATAATTCTCAAAGGGAAC
TFB-A49N-Rv	GTTCCCTTTGAGAATTATCAAAAGCAGCCCACTCAGGACCC
TFB-R57A-Fw	CAAAGGGAACGCAGGTCTGCAACTGGTGCACCAGAAAG
TFB-R57A-Rv	CTTTCTGGTGCACCAGTTGCAGACCTGCGTTCCCTTTG
TFB-R57E-Fw	CAAAGGGAACGCAGGTCTGAACTGGTGCACCAGAAAG
TFB-R57E-Rv	CTTTCTGGTGCACCAGTTTTCAGACCTGCGTTCCCTTTG
TFB-R79D-Fw	GCTTTCAACTGAAATTGGAATTGACGACTCGCTTTCCGGATTAATGAGAGAG
TFB-R79D-Rv	CTCTCTCATTAATCCGGAAGCGAGTCGTCAATTCCAATTTTCAGTTGAAAGC
TFB-R86D-Fw	CAGATCGCTTTCCGGATTAATGGATGAGAAGATGTACCGTTTGAGGA
TFB-R86D-Rv	TCCTCAAACGGTACATCTTCTCATCCATTAATCCGGAAGCGATCTG
TFB-K88E-Fw	CCGGATTAATGAGAGAGGAGATGTACCGTTTGAGG

TFB-K88E-Rv	CCTCAAACGGTACATCTCCTCTCTCATTAATCCGG
TFB-L92A-Fw	AGAGAGAAGATGTACCGTGCGAGGAAGTGGCAGTCCAG
TFB-L92A-Rv	CTGGACTGCCACTTCTCTCGCACGGTACATCTTCTCTCT
TFB-L92P-Fw	AGAGAGAAGATGTACCGTCCGAGGAAGTGGCAGTCCAG
TFB-L92P-Rv	CTGGACTGCCACTTCTCTCGGACGGTACATCTTCTCTCT
TFB-R93D-Fw	GAGAGAGAAGATGTACCGTTTGGATAAGTGGCAGTCCAGATTAAGAG
TFB-R93D-Rv	CTCTTAATCTGGACTGCCACTTATCCAAACGGTACATCTTCTCTCTC
TFB- Δ readerturn-Fw	CTAGAACTGGTGCACCAGACAAGGGGCTTTCAAC
TFB- Δ readerturn-Rv	GTTGAAAGCCCCCTGTCTGGTGCACCAGTTCTAG
TFB-readerturnAla-Fw	GTGCACCAGAAAGTGCTGCTGCTCATGACAAGGG
TFB-readerturnAla-Rv	CCCTTGTCATGAGCAGCAGCACTTTCTGGTGCAC
TFB- Δ linkerstrand-Fw	CTTCTTTCATGACAAGGGGGGAATTGACAGATCGCTT
TFB- Δ linkerstrand-Rv	AAGCGATCTGTCAATTCCCCCTTGTCATGAAGAAG
TFB-linkerstrandAla-Fw	GACAAGGGGGCTGCAGCTGAAGCTGGAATTGAC
TFB-linkerstrandAla-Rv	GTCAATTCCAGCTTCAGCTGCAGCCCCCTTGTC
TFB- Δ linkerhelix-Fw	GAATTGACAGATCGCTTTCCGGATTATCCAGATTAAGAGTTAG
TFB- Δ linkerhelix-Rv	CTAACTCTTAATCTGGATAATCCGGAAGCGATCTGTCAATTC
TFIIB-E62R-Fw	TAAACTGGTTGACACCAGGTCGCGTTGGAGAACGTTTCAAATGATG
TFIIB-E62R-Rv	CATCATTTGAAAACGTTCTCCAACGCGACCTGGTGTCAACCAGTTTA
TFIIB-R64E-Fw	TGACACCAGGTCGGAGTGGGAAACGTTTCAAATGATGATC
TFIIB-R64E-Rv	GATCATCATTTGAAAACGTTTCCCACTCCGACCTGGTGTCA
TFIIB-F66D-Fw	CAGGTCGGAGTGGAGAACGGATTCAAATGATGATCACAACG
TFIIB-F66D-Rv	CGTTGTGATCATCATTTGAATCCGTTTCTCCACTCCGACCTG
TFIIB- Δ readerC-Fw	GATGATCACAACGGTGATGACGCTTCAAATCCTCTTTTAGAT
TFIIB- Δ readerC-Rv	ATCTAAAAGAGGATTTGAAGCGTCATCACCCTTGATCATC
TFIIB- Δ readerturn-Fw	CCCAAGTCGTGTTGGTGAGGCTGGGAATAACCTA
TFIIB- Δ readerturn-Rv	TAGGTTATTCCCAGCCTCACCAACACGACTTGGG
TFIIB-readerturnAla-Fw	GGTGAGGCTTCAAATGCTGCTGCAGATGGGAATAACCTATCTA
TFIIB-readerturnAla-Rv	TAGATAGGTTATTCCCATCTGCAGCAGCATTTGAAGCCTCACC
TFIIB- Δ linkerstrand-Fw	TCTTTTAGATGGGAATAACGGAAAGGGTGAAACCACGG
TFIIB- Δ linkerstrand-Rv	CCGTGGTTTTCACCTTTCCGTTATTCCCATCTAAAAGA
TFIIB-linkerstrandAla-Fw	CCTCTTTTAGATGGGAATAACGCAGCTGCAAGGGCCGGAAAGGGTGAAACCACGG
TFIIB-linkerstrandAla-Rv	CCGTGGTTTTCACCTTTCCGGCCCTTGAGCTGCGTTATTCCCATCTAAAAGAGG
TFIIB- Δ linkerhelix-Fw	TCGGAAAGGGTGAAACCACGGATGGAAAAAATGTGATG
TFIIB- Δ linkerhelix-Rv	CATCACATTTTTTCCATCCGTGGTTTTCACCTTTCCGA

D) Oligonukleotide für die Promotormutagenese

MiniBubF	CCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCTTTAATGTATCGTTAATGAGGTAATTTGGA
MiniBubR	TCCAAATTACCTCATTAACGATACATTAAAGGGCAATAGCCTATATAAAGCTTTCCG
MiniStartF	TTATATAGGCTATTGCCCAAAAATGTATTACTAATGAGGTAATTTGGAGCATATGGGG
MiniStartR	CCCCATATGCTCCAAATTACCTCATTAGTAATACATTTTTTGGGCAATAGCCTATATAA
10_20_WT_NT	ACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCAAAAATGTATCGCCAATCACC
10_20_WT_T	TAATTTGGAGGGATGAACATGGTTGAGCAAG
10_20_3O_NT	CTTGCTCAACCATGTTTCATCCCTCCAAATTAGGTGATTGGCGATACATTTTTGGGCAAT
10_20_3O_T	AGCCTATATAAAGCTTTCCGTAACAAGAGT
BT_NT	ACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCTTTAATGTATCGCCAATCACC
	TAATTTGGAGGGATGAACATGGTTGAGCAAG
	CTTGCTCAACCATGTTTCATCCCTCCAAATTAGGTGATTGGCGATACATTAAAGGGCAAT
	AGCCTATATAAAGCTTTCCGTAACAAGAGT
	ACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCTTTTACATAGCGGAATCACCTAA
	TTTGGAGGGATGAACATGGTTGAGCAAG

Hybridisierung

10_20_WT_T + 10_20_3O_NT

```
                    TTT
5' ACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCC   AATGTATCGCCAATCACCTAATTTGGAGGGATGAACATGGTTGAGCAAG
3' TGAGAACAATGGCTTTCGAAATATATCCGATAACGGGTTTTACATAGCGGTTAGTGGATTAAACCTCCCTACTTGTACCAACTCGTTC
```

10_20_3O_T + 10_20_WT_NT

```
5' ACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCCAAAAATGTATCGCCAATCACCTAATTTGGAGGGATGAACATGGTTGAGCAAG
3' TGAGAACAATGGCTTTCGAAATATATCCGATAACGGG   TTACATAGCGGTTAGTGGATTAAACCTCCCTACTTGTACCAACTCGTTC
                    AAA
```

10_20_WT_T + BT_NT

```
                    TTTTACATAGCGG
5' ACTCTTGTTTACCGAAAGCTTTATATAGGCTATTGCCCA   AATCACCTAATTTGGAGGGATGAACATGGTTGAGCAAG
3' TGAGAACAATGGCTTTCGAAATATATCCGATAACGGGTTTTACATAGCGGTTAGTGGATTAAACCTCCCTACTTGTACCAACTCGTTC
```

III) Methoden

A) Klonierung

P. furiosus TFB wurde während der Doktorarbeit von Bernd Goede (2003) mit einem N-terminalen His₆-Tag in pET14b (Novagen) über *Bam*HI und *Nde*I Schnittstellen kloniert. RNAP-Untereinheiten wurden während der Doktorarbeit von Souad Naji (2007) kloniert: L und N wurden in pET30 ohne His-Tag kloniert, alle anderen Untereinheiten wurden in pET151/D-TOPO kloniert und besitzen einen mit N-terminalem His₆-Tag. TFIIB von *S. cerevisiae* wurde von Anass Jawhari (Labor P. Cramer) mit C-terminalem His₆-Tag in pET30 kloniert.

1. Transformation von *E. coli*

Je nach Verfügbarkeit wurden kommerzielle oder selbst hergestellte kompetente Zellen (*E. coli* Stämme XL1, JM109, DH5 α oder TOP10) transformiert. Entsprechend ihrer Transformationseffizienz wurden 25-150 μ l Zellen pro Reaktion verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-3 μ l DNA für 15 min auf Eis inkubiert, 45-50 sec im 42°C Wasserbad Hitze-geschockt, 1-2 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 175 - 450 μ l SOC medium (2% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) für 1 h bei 37°C am Schüttler regeneriert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf 1-2 LB-Platten mit Antibiotika ausplattiert.

2. Gelreinigung von Primern

10 μ l einer 100 μ M Primerlösung in Tris-HCl pH 8 wurden mit 5 μ l 3xFA-Puffer (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylenecyanol FF) versetzt, 3 min bei 95°C denaturiert und in einem 12-15% PA/ 6 M Harnstoffgel aufgetrennt (750V, 25mA, ca. 40 min). Zur Sichtbarmachung der Nukleinsäuren wurde das Gel auf Frischhaltefolie über eine DC-AF Keiselgel 60 F₂₅₄ Platte gelegt und mit UV-Licht bestrahlt (*UV-Shadowing*). Die obere Hälfte der Primerbande wurde ausgeschnitten und das Gelstück in ein Eppendorf Gefäß transferiert. Die Primer-DNA wurde in 360 μ l TE' (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA) und 40 μ l 3 M Natriumacetat pH 5.2 am Schüttler über Nacht bei 37°C eluiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß transferiert und die DNA mit 20 μ g Glykogen und 800 μ l 99% Ethanol präzipitiert. Nach 30 min Inkubation bei -80°C wurde 30 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert, das DNA-Pellet mit 700 μ l 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert.

Die DNA-Konzentration der Primerlösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm mit dem Nanodrop bestimmt. Der spezifische Extinktionskoeffizient jedes Oligos wurde mit dem Rechner der Webseite <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> ermittelt.

3. Sequenzspezifische Mutagenese von Plasmiden

Die ersten Punktmutanten wurden mit dem QuickChangeII-Site-directed Mutagenesis-Kit nach Herstellerprotokoll erzeugt. Später wurde diese Methode nachgeahmt, wobei nach Optimierung höhere Effizienzen als mit dem Kit erzielt werden konnten, als mit dem

kommerziellen Kit. Die Mutagenese-Primer wurden mittels Primer-Design Programm auf der Website www.stratagene.com entworfen.

Die Reaktionseffizienz wurde deutlich gesteigert, wenn Mutagenese-Primer über Gel gereinigt wurden und das zu mutierende Plasmid phenolextrahiert und Ethanol-gefällt wurde. Die Reaktionen wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 1x Buffer (+MgSO₄) durchgeführt und enthielt 2 µM dNTPs, je 12.5 pmol *Forward*- und *Reverse*-Primer, 35-100 ng Plasmid und 1.25 U *Pfu* DNA-Polymerase (Fermentas oder Segenetic). Die Phusion-Polymerase (Finnzymes) funktionierte unter den von mir getesteten Bedingungen nicht. Entscheidend war, die Reaktion bei nicht optimaler Temperatur des Enzyms durchzuführen: 1x 30 sec 95°C, 16x (30 sec 95°C, 1 min 55°C, 1 min/kb 68°C), 4°C. Bei Deletions- und manchen Mehrfachpunktmutanten wurde die Annealing Temperatur auf 45°C reduziert. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert, 10 U *DpnI* zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde wieder kurz zentrifugiert, auf Eis gestellt und mit 2 µl der Reaktion transformiert.

Von 3-5 Transformanden wurde das Plasmid isoliert und die Mutation mittels Sequenzierung bestätigt. Durchschnittlich waren 30-100% der Klone positiv.

4. Sequenzspezifische Mutagenese mittels Fusions-PCR

Einzelne Mutanten ließen sich nicht über die direkte Mutagenese am Plasmid herstellen. Die Genmutationen wurden über Fusions-PCR mit den vorhandenen Mutagenese-Primern sowie M13-, T7-, oder TOPO-kompatiblen Außenprimern hergestellt. Wenn nötig, wurden Fusions-PCR-Produkt und Vektor mit Restriktionsenzymen geschnitten, über Agarosegel und PCR-Purification Kit gereinigten und die Fragmente mit dem Quick-Ligation Kit laut Hersteller ligiert. Alternativ wurde das amplifizierte Gen mittels TOPO-Klonierungs Kit laut Herstellerprotokoll ligiert. Die Klone wurden wieder über Restriktion und Sequenzierung bestätigt.

5. Transformation von *S. cerevisiae* und Herstellung des Hefestammes AM7

Der heterozygote SUA7/sua7D (G418 resistente) Stamm BY4743 wurde mit dem centromerischen Plasmid pRS316_TFIIB (Sikorski und Hieter, 1989) welches 500 bp upstream und 300 bp downstream des essentiellen TFIIB Gens (SUA7) sowie den URA3 Marker enthielt, transformiert. Diploide Zellen wurden sporuliert, -ura und G418-resistente Tetraden wurden gepickt und auf YPD-Platten übertragen. Damit erhielt man den homozygoten Stamm AM7, welcher einen genomischen Knock-out von TFIIB trägt und ein Plasmid enthält, welches TFIIB unter dem endogenem Promoter kodiert (durchgeführt vom Labor P. Cramer).

Eine AM7 Einzelkultur wurde von einer YPD-Platte in 5 ml YPD-Flüssigmedium inokuliert und über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml YPD-Medium auf eine Start-OD₆₀₀ von 0.25 beimpft und bei 30°C schüttelnd bis OD₆₀₀ 0.8-0.9 inkubiert. Die Kultur wurde in zwei 50-ml-Falcongefäßen im Ausschwingrotor für 3 min bei 4 000 rpm (RT) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in jeweils 25 ml Wasser durch Vortexen resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 2 500 rpm (RT) wurden die Pellets in 1 ml 100 mM LithiumAcetat (frisch verdünnt von einer 1 M Stammlösung) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1.5-ml-Eppendorf Gefäß übertragen und durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in 15 sec pelletiert, der Überstand mit der Pipette entfernt und die Zellen in je ca. 400 µl 100 mM Lithiumacetat

resuspendiert. Die Zellen wurden zu 100 µl in Eppendorf Gefäße aliquotiert und bis zur Transformation mindestens eine, bis zu 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt.

Vorbereitungen für die Transformation: Einzelsträngige Lachs-Sperma-DNA (2 mg/ ml, Sigma) wird für 5 min bei 95°C gekocht und auf Eis gestellt (ssDNA). Zu 2 µl des zu transformierenden Plasmids (pRS315_TFIIBwt oder pRS315_TFIIBmut) werden 32 µl Wasser zugegeben. Eine Mischung aus Ethylenglykol PEG 3,35 (50% w/v):1 M LithiumAcetat pH 7.5 = 240 : 36 wird hergestellt (PEG/LiAc).

Zu 100 µl Zellen werden dann 50 µl ssDNA, 34 µl Plasmidverdünnung und 276 µl PEG/LiAc gegeben. Nach 1 min Vortexen wurden die Zellen 30 min bei 30°C inkubiert, 15 min bei 42°C Hitze geschockt, 15 sec bei 6 000 rpm pelletiert und in 200 µl TE pH 7.5 resuspendiert. Die Zellen werden auf zwei -ura/-leu Platten (je 20 µl und 180 µl) ausplattiert und zwei Tage bei 30°C bebrütet.

6. Komplementationsversuche mit *S. cerevisiae* TFIIB Mutanten

Mehrere Einzelkolonien auf der Transformationsplatte wurden erneut auf -ura-leu-Platten vereinzelt, danach auf Platten mit YPD-Medium überstrichen (Vorselektion auf partiellen Plasmidverlust). Zellmaterial in Größe eines Stecknadelkopfes wurde in 200 µl Wasser resuspendiert und eine Verdünnungsreihe in Wasser (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5}) hergestellt, davon je 3 µl auf eine Platte mit 5-FOA-Medium und eine Platte mit YPD-Medium pipettiert. 5-FOA Platten wurden nach 3 bis 5 Tagen, YPD-Platte nach 2 Tagen ausgewertet.

Herstellung der 5-FOA-Platten: 4% Agar wurde in einer 1-l-Flasche zusammen mit einem Rührfisch autoklaviert. Eine 500 ml Lösung, die 1 g 5-FOA, 6.9 g yeast nitrogen base (FORMEDIUM), 770 mg complete aa (FORMEDIUM), 250 µl Uracil (250 mg/ml) und 20 g Glukose enthält, wurde sterilfiltriert (Millipore). Die Lösung wurde unter langsamem Rühren in den noch warmen aber nicht zu heißen Agar zugegeben, die Platten sofort gegossen.

7. Kultivierung von *S. cerevisiae* TFIIB Mutanten

Einzelkolonien lebensfähiger Klone (alle bis auf *Δlinker strand* und *linker strand Ala*) wurden noch einmal auf 5-FOA medium ausgestrichen und dann auf eine YPD-Platte übertragen. Von dieser Platte wurde eine Verdünnungsreihe in Wasser hergestellt (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5}), und 3 µl auf YPD-Platten aufgetragen. Die Platten wurden bei 16°C (5 Tage), 30°C (2 Tage) oder 37°C (2 Tage) bebrütet.

Die Wachstumskurven der TFIIB-mutanten Hefestämme wurde in YPD-Flüssigmedium bestimmt: Eine Übernachtskultur in 5 ml YPD wurde auf OD₆₀₀ 0.1-0.15 verdünnt und die Optische Dichte bei 600 nm bis zum Übergang in die stationäre Phase verfolgt. Wildtyp sowie alle Mutanten erreichten diese bei ca. OD₆₀₀ = 11-12.

Alle Wachstumsversuche wurden mindestens drei Mal durchgeführt.

B) Protein Methoden

TBP wurde freundlicherweise von Winfried Hausner zur Verfügung gestellt. Die RNAP-Untereinheiten wurden wie beschrieben (Goede et al., 2006) von W. Forster (H, D, E und F), oder mit einigen Abwandlungen selbst aufgereinigt. Wildtypischer nuklearer Extrakt von *S. cerevisiae* wurde selbst hergestellt oder von M. Seizl (Labor P. Cramer) zur Verfügung gestellt.

1. Expression

Alle von mir gereinigten RNAP-Untereinheiten (B, A', A'', P, L, N, K) sowie TFS konnten in *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus-RIL exprimiert werden. Die Expression von TFB war nur in *E. coli* BL21(DE3)pLysS möglich.

Expressionsstämme wurden in Gegenwart von 100 mg/l Ampizillin (B, A', A'', P, K, TFB) oder 50 mg/l Kanamycin (L, N) und 50 mg/l Chloramphenicol in LB-medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Peptone) bis OD 0.8 gezogen und dann 30 min auf Eis inkubiert, durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0.5 mM) induziert, und schüttelnd bei 18°C für 16-20 Stunden weiterinkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min, 6 000 rpm, 4°C, JA 10 Rotor) und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2. Reinigung rekombinanter *P. furiosus* RNAP Untereinheiten

i) Reinigung von Untereinheiten aus *Inclusion Bodies* (B, A', A'' und K).

Ungefähr 4 g Zellpellet wurden in 25 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF und einer Tablette Protease Inhibitor Cocktail resuspendiert, eine Spatelspitze Lysozym zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 3-4x 30 sec Ultraschall (Output: ca. 30%) wurde abzentrifugiert (15 min 18 000 rpm, 4°C, SS34 Rotor), das Pellet in 20-25 ml IB buffer I (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Harnstoff, 500 mM NaCl, 0.1% Tween, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF) mit Hilfe eines Potters resuspendiert, die Suspension wie oben für 3x 30 sec beschallt und zentrifugiert. Der Resuspension-Ultraschall-Zentrifugations Zyklus wurde mit IB buffer I und IB buffer II (wie I ohne Harnstoff) wiederholt, das Pellet bei -20°C eingefroren.

Die Inclusion Bodies wurden auf Eis aufgetaut, in 25 ml Binding Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 6 M Guanidin-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF) resuspendiert und durch Inkubation für 1 h bei RT mit wiederholtem Vortexen vollständig solubilisiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18 000 rpm, 4°C, SS34 Rotor) wurde der Überstand filtriert und auf die NiNTA Säule (HiTrap Chelating HP 5 ml) aufgetragen.

ii) Affinitätsreinigung von B, A', A'' und K – Basisprotokoll

Es wurde mit 3 CV Binding Buffer und 3 CV Washing Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 6 M Harnstoff, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF) gewaschen, der Harnstoff über einen linearen Gradienten von 10 CV entfernt, weitere 10 CV gewaschen und dann über einen linearen Gradienten von 15 CV zu 500 mM Imidazol oder schrittweise eluiert. Die Flussrate war 0.5 ml/min.

Besonderheiten bezüglich einzelner Untereinheiten:

B, K Da B und K stark zur Präzipitation tendieren, enthielten Refolding- sowie Elutionspuffer 20% Glycerin. Elution erfolgte über einen Gradient von 15 CV bei 0.5 ml/min, um zu hohe Konzentrationen zu vermeiden. Die Löslichkeitsgrenze beträgt für B ca. 1.1 µg/µl, für K ca. 300 ng/µl.

A' Um Untereinheit A' in ausreichender Konzentration für die Rekonstitution zu erhalten, war eine schrittweise Elution notwendig. Es wurde mit 4 CV 40 mM Imidazol (5% Elutionspuffer, enthält 500 mM Imidazol) gewaschen und bei ca. 200 mM Imidazol (40% Elutionspuffer) über 5 CV eluiert.

Das Protein wurde aufgrund seiner Instabilität sofort bei -80°C gelagert. Schon über Nacht bei 4°C treten zunehmend Zersetzungsprodukte auf, welche durch weitere Reinigungsschritte (MonoQ oder Gelfiltration) nicht entfernt werden konnten (nicht gezeigt). Auch kann die Untereinheit nach einmaligem Auftauen nicht mehr verwendet werden.

A'' Da ein Großteil des Proteins bereits bei 2 M Harnstoff löslich ist, wurde Untereinheit A'' aus den Überständen der Inclusion Body Waschschrte mit IB buffer I gereinigt. Der Überstand wurde filtriert (0.45 µm Filter), auf die NiNTA Säule aufgetragen, der Harnstoff über einen linearen Gradient von 10 CV entfernt und weitere 10 CV gewaschen. A'' eluierte über einen linearen Gradienten zu Puffer mit 500 mM Imidazol über 15 CV bei einer Flussrate von 0.5 ml/min.

iii) Reinigung löslicher Untereinheiten

L, N Zellpellets wurden in 20 ml Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM NaCl, 10% Glycerol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail) resuspendiert, eine Spatelspitze Lysozym zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluss erfolgte durch Ultraschall auf Eis (4x 60 sec, Output ca. 35%). Die Reinheit der Untereinheit L war nach Hitzeschritt (20 min, 90°C) und Zentrifugation (15 min, 18 000 rpm, 4°C, SS34-Rotor) hinreichend. Der Überstand mit Untereinheit N wurde filtriert (45-µm Filter) und auf eine 1-ml-MonoQ 5/50 GL Säule aufgetragen. Eluiert wurde bei einer Flussrate von 0.5 ml/min über 15 CV mit einem linearen Gradient zu Puffer mit 1 M NaCl, wobei N bei ca. 250 mM NaCl eluierte.

P Das Zellpellet wurde in 10 ml/g Lysepuffer (50 mM HEPES-Na pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und dann mit Ultraschall aufgeschlossen (3-4x 30 sec, Output ca. 30%). Nach Zentrifugation (15 min, 18 000 rpm, 4°C, SS34 Rotor) wurde der Überstand für 20 min bei 90°C inkubiert und präzipitierte *E. coli* Proteine abzentrifugiert (15 min 18 000 rpm, 4°C, SS34 Rotor). Der Überstand wurde filtriert (45-µm Filter) und auf eine 5 ml-HiTrap-SP-HP Säule aufgetragen, die in CEX-Bindungspuffer (40 mM HEPES-Na pH 7.5, 10 mM NaCl, 10% Glycerol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) equilibriert war. Nach Waschen mit ca. 5 CV wurde über einen Gradienten mit 10 CV CEX Puffer mit 1 M NaCl eluiert.

3. Rekombinantes TFB von *P. furiosus*

Aufgetaute Zellpellets wurden in NiNTA-Bindepuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10% Glycerol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF) resuspendiert. Nach dreimaligem Passieren der Zellsuspension durch die French Press wurde das Lysat zentrifugiert (30 min, 20 000 rpm, 4°C, JA-25.50 Rotor). *E. coli* Proteine konnten durch einen 15 minütigen Hitzeschritt bei 70°C und erneuter Zentrifugation (20 min, 20 000 rpm, 4°C, JA-25.50 Rotor) teilweise entfernt werden. Der Überstand wurde durch einen 45-µm-Filter filtriert und anschließend auf eine NiNTA Säule (HisTrap Chelating HP 5 ml) aufgetragen. Innerhalb eines linearen Gradienten über 10 CV bis 500 mM Imidazol eluierte TFB bei 200 mM Imidazol.

Ein koeluierendes 10 kDa Polypeptid konnte über Gelfiltration (HiLoad 16/60 Superdex 75) bei einer Flussrate von 0.5 ml/min entfernt werden. Gelfiltrationspuffer war 20 mM NaHepes pH 7.8, 250 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% Glycerol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF. Das Elutionsprofil zeigte stets zwei Peaks, wobei der erste Peak nach 45 ml TFB und ein zweites unbekanntes Protein enthielt, während der zweite Peak nach 57 ml ausschließlich TFB enthielt.

Bei der Quantifizierung stellte sich heraus, dass die Methode nach Bradford zu ungenau war. Daher wurde die Konzentrationen verschiedener TFB-Mutanten mittels Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamid Gelen angeglichen.

4. Rekombinantes TFS von *P. furiosus*

Aufgetaute Zellpellets wurden in 20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl und 1 mM DTT, und einer Spatelspitze Lysozym resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat auf Eis sonifiziert (4-5x 1 min, Output 35%). Nach Zentrifugation (1 h, 20 000 rpm, 4°C, SS34-Rotor) wurde der Überstand für 30 min bei 95°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren ausgefallener *E. coli* Proteine (20 min, 20 000 rpm, 4°C, SS34-Rotor) wurde der Überstand filtriert (0.45 µm Filter) und mittels Ultrazentrifugation (Millipore MWCO 10,000) auf 7 ml aufkonzentriert. In zwei Läufen wurde die Proteinlösung über eine HiLoad 16/60 Superdex 75 Säule in Gelfiltrationspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl) aufgetrennt. TFS eluierte nach 80 ml in rötlich gefärbten Fraktionen. Die Fraktionen wurden gepoolt, mit 20 mM Tris-HCl pH 8 auf 20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl verdünnt und über Ionenaustausch-Chromatographie (1 ml-MonoQ 5/50 GL) über 15 Säulenvolumen bis Puffer mit 1 M NaCl bei einer Flussrate von 1 ml/min weiter aufgereinigt. TFS eluierte bei einer Salzkonzentration zwischen 200 und 350 mM NaCl.

5. Rekonstitution der RNAP von *P. furiosus*

Eine Mischung der RNAP Untereinheiten zu je 2250 pmol in 1 bis 1.5 ml wurde mittels Dialysekassette (0.5-3 ml, MWCO 3 500, Thermo Fischer Scientific) für 15 min in eiskaltem TB-6 (6 M Harnstoff, 40 mM HEPES-Na pH 7.3, 250 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM ZnSO₄, 10% Glycerol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF) unter mäßigem Rühren denaturiert. Es folgte schrittweises Renaturieren in eiskaltem TB-3 (TB-6 mit 3 M Harnstoff) für 15 min, in TB-0 (TB-6 ohne Harnstoff) für 1 Stunde bei RT. Die rekonstituierte RNAP wurde einem Hitzeschritt für 10 min bei 70°C unterzogen und präzipitierte Proteine abzentrifugiert (10 min, 13 000 rpm, RT). Der Überstand wurde auf eine in TB-0 equilibrierte Superdex-200-10/300-GL Säule geladen. Bei einer Flussrate von 0.2 ml/min eluierte die Polymerase in einem Bereich zwischen 8 und 10 ml. Die Aktivität

wurde in einer Run-Off Transkription ermittelt (12.5 µl Fraktion pro Ansatz), die Integrität der RNAPs anhand eines silbergefärbten SDS-Gels nachgewiesen.

Die Konzentration der rekonstituierten RNAPs war zu gering, um sie über die Absorption bei 280 nm oder mit dem Bradford-Reagens zu bestimmen. Daher wurden unterschiedliche RNAPs auf einem 4-20% Gradienten SDS-Gel verglichen, welches mit Silber (semi-quantitativ) oder SyproOrange® (quantitativ) gefärbt wurden. Die Volumina wurden so lange angepasst, bis die Banden-Intensität der einzelnen Untereinheiten gleich war.

6. Nuklearer Extrakt von *S. cerevisiae*

Die Aufreinigung des Hefe-Kernextraktes erfolgte entsprechend der Angaben auf der Homepage des Labors von Steve Hahn (www.fhcrc.org/labs/hahn).

Drei Mal 1 l YPD Medium mit Tetracyclin (50mg/l) wurden in 5-l-Erlenmayer Flaschen mit einer Übernachtskultur (Wildtyp und Stamm SHY245) so angeimpft, dass morgens die OD₆₀₀ 4-5 betrug. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4 000 rpm, RT, SLC-6000 Rotor) geerntet, in 35 ml 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA, 30 mM DTT resuspendiert und 15 min bei 30°C regeneriert. Nach Pelletieren der Zellen (8 min, 4 000 rpm, RT, GS-A-Rotor) wurden sie in 20 ml YPD/S (1 M Sorbitol, 2% Bacto-Pepton, 2% Dextrose, 1% Hefeextrakt) resuspendiert, wiederholt zentrifugiert und in 20 ml YPD/S resuspendiert, 3 ml 2 M Sorbitol sowie 6 mg/ml Zymolyase 100T zugegeben und bei 30°C inkubiert. Die Sphäroplastierung wurde über Messung der OD₆₀₀ verfolgt: 2 µl Zellen wurden mit 1 ml MilliQ-Wasser gemischt, wobei die Späroplasten platzen. Die typische Start OD₆₀₀ lag bei etwa 0.8, nach 30 min waren ca. 90% der Zellen sphäroplastiert (OD₆₀₀ < 0.05).

Es wurden 100 ml YPD/S zugegeben, die Späroplasten pelletiert (4 000 rpm, 12 min, RT, GSA-Rotor), in 250 ml YPD/S (RT) resuspendiert, 30 min bei 30°C regeneriert, wie zuvor pelletiert, in 200 ml eiskaltem YPD/S resuspendiert und von nun an auf Eis gekühlt. Die Späroplasten wurden wie zuvor bei 4°C abzentrifugiert, in 250 ml kaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, noch einmal zentrifugiert, Sorbitol bestmöglich abgenommen, in eiskaltem Buffer A (18% Ficoll, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 0.5 mM Spermidine, 0.15 mM Spermine, 3 mM DTT, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und auf Eis durch einen Yamamoto LH1 Homogenizer passiert. Die Zellmasse wurde zentrifugiert (8 min, 5 000 rpm, 4°C, GSA-Rotor), der Überstand in neue GSA-Becher transferiert und wie zuvor abzentrifugiert. Der Schritt wurde bis zu vier Mal wiederholt bis fast ausschließlich ein festes Pellet zu sehen war. Der Überstand (Rohpräparation der Kerne) wurde in SS34-Rotorgefäße transferiert und pelletiert (30 min, 13 000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in 10 ml Buffer B (100 mM Tris-Ac pH 7.9, 50 mM KAc, 10 mM MgAc, 20% Glycerol, 2 mM EDTA, 3 mM DTT, Proteaseinhibitormix) resuspendiert, in 50-ml-Falcongefäße transferiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Fortsetzen der Präparation auf -80°C aufbewahrt.

Die Kerne wurden auf Eis aufgetaut und ein Fünftel des Volumens 3 M Ammoniumsulfat, pH 7.5 zugegeben (Endkonzentration 0.5 M). Während der anschließenden 30 minütigen Inkubation auf dem Rollerdrum bei 4°C wurden die Kerne lysiert, Klumpen wurden nach 10 min mit dem Glasstab zermalen. Es folgte eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (90 min, 28 000 rpm, 4 °C, SW28 Rotor). Der Überstand wurde mit einer Glaspipette in ein 50-ml-Falcongefäß transferiert, mit 0.35g/ml Ammoniumsulfat versetzt und am Rollerdrum 30 min bei 4°C inkubiert.

Nach Zentrifugation (20 min, 10 000 rpm, 4°C, SW28 Rotor), wurde der Überstand abgeleert und die Pellets noch einmal zentrifugiert (10 min, 10 000 rpm, 4°C, SW28 Rotor) um den Überstand komplett abnehmen zu können. Pellets wurden mittels Plastikstäbchen in 400-800 µl Buffer C (20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 10 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 20% Glycerol, 3 mM DTT, Proteaseinhibitormix) resuspendiert. Der Kernextrakt wurde über 4.5 Stunden gegen 3x 500 ml Buffer C +75 mM Ammoniumsulfat dialysiert, aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration des Kernextraktes wurde mittels Bradford-Reagens (Biorad) bestimmt und lag bei allen Präparationen bei etwa 40 µg/µl.

7. Rekombinantes TFIIB von *S. cerevisiae*

Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 6 000 rpm, 4°C, SLC-6000 Rotor) geerntet, in 40 ml Freezing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% Glycerol) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellsuspension wurde im warmen Wasserbad aufgetaut und durch 15 min Ultraschall (Output 35%) auf Eis in einem Rossettaggefäß lysiert. Nach Zentrifugation des Lysats (45 min, 13 000 rpm, 4°C, SS34 Rotor) wurde der Überstand abgenommen, dessen Salzkonzentration auf 500 mM NaCl angepasst, halbiert und mit je 1 ml equilibrierten NiNTA beads (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl) in einem Falcon gemischt. Die Röhrchen wurde auf einem Rotationsschüttler 1 h bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden zwei Mal mit 50 ml Puffer + 5 mM Imidazol gewaschen und TFIIB mit insgesamt 6 ml Puffer + 250 mM Imidazol eluiert. Die Probe wurde mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 auf 150 mM NaCl verdünnt, und mittels Ultrazentrifugation (Amicon, MWCO 10,000 Da) aufkonzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine MonoS-HR-5/5 Säule aufgetragen, TFIIB eluierte während einem linearen Gradient von 15 CV bis Puffer mit 575 mM NaCl. Ein kontaminierendes ca. 30 kDa C-terminales Fragment (Massenspektrometrie zeigte, dass es sich um TFIIB-Core handelt, persönliche Mitteilung von A. Jawhari) konnte größtenteils durch einen Gelfiltrationsschritt mit einer Superose-6-10/300-GL Säule bei einer Flussrate von 0.4 ml/min entfernt werden. Gelfiltrationspuffer war 10 mM HEPES-Na pH 7.3, 40 mM Ammoniumsulfat, 5% Glycerol, 10 µM ZnCl₂.

C) Herstellung von Matrizen

1. Standard Transkriptionsmatrize

Als Standard-Transkriptionsmatrize wurde *gdhC20* verwendet, welches, kloniert in pUC19, über PCR mit M13 Primern amplifiziert wurde (297 bp). Die Reaktion enthielt 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 15 ng Plasmid *gdh-C20*, je 0.3 mM M13*forward* und M13*reverse* Primer, 2 U Taq DNA-Polymerase in 1x Taq-Puffer. Amplifikation erfolgte durch 3 min 95°C, 26x (5 sec 95°C, 30 sec 60°C, 30 sec 72°C), 5 min 72°C, 4°C. Nach Reinigung mit dem PCR Purification Kit wurde die Reinheit am Agarosegel überprüft (Länge 297 bp). Run-Off Transkription ergibt ein 113 nt RNA Produkt, Transkription mit drei Nukleotiden (ATP, GTP und UTP) stellt Elongationskomplexe bei Position +20 (EC20).

2. Vorgeöffnete Matrizen

Vorgeöffnete Matrizen enthielten Basenfehlpaarungen in der *gdh-C20* Matrize an den Positionen -9, -10 und -11 (*open upstream*, O^U) oder an -1, +1 und +2 (*open start*, O^S)

relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1. Die Mutationen wurden über Fusions-PCR mit Primern MiniBubF und MiniBubR (O^U) oder MiniStartF und MiniStartR (O^S) eingeführt. Mutierte und originale DNA Sequenz wurde gegengleich mit jeweils einem phosphorylierten und einem nicht-phosphorylierten M13-Primer amplifiziert. Die Produkte wurden mit dem PCR Purification Kit gereinigt und mit dem Nanodrop quantifiziert. In einer 100 µl Reaktion in 1x Reaktionspuffer wurden 40 nmol PCR-Produkt mit 20 U λ -Exonuklease für 1 h bei 37°C inkubiert und der Abbau eines Einzelstranges am Agarosegel bestätigt. Wildtypischer Templat-Strang wurde mit mutiertem Nicht-Templat-Strang in einem Volumen von 15 µl in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 wie folgt hybridisiert: 5 min 95°C, 15 min 45 °C, 15 min 40°C, kurz zentrifugieren, 5 min 40°C. Die Hybridisierung wurde wieder am Agarosegel überprüft, die Matrizen wurden bei 4°C aufbewahrt.

Da in Transkriptionen auf der *upstream Minibubble* kein Unterschied festzustellen war, ob der Template- oder der Nicht-Template-DNA-Strang mutiert war, wurde im Folgenden auf den λ -Exonuklease-Verdau verzichtet. Mutierte und original PCR-Produkte wurden equimolar gemischt und wie oben de- und renaturiert. Es liegt dann eine Mischung aus offenen und geschlossenen Matrizen vor. Die Hybridisierungs-Produkte wurden aus dem Agarosegel und mit dem PCR-Purification Kit gereinigt. Als Kontrolle wurde jeweils das originale PCR-Produkt denaturiert, renaturiert und wie die offene Matrize aufgereinigt (*geschlossene Matrize*). Die Matrizen werden bei 4°C aufbewahrt.

Zur Herstellung synthetischer Matrizen (*Bubble 1, Closed L, Bubble L1, Bubble L2*) wurden Oligonukleotide (s. Kap. II.D) über Gel gereinigt, Templat und Nicht-Templat-Stränge equimolar gemischt und wie folgt de- und renaturiert: 5 min 95°C, 15 min 45 °C, 15 min 40°C, kurz zentrifugieren, 5 min 40°C. Die hybridisierten Matrizen werden bei 4°C aufbewahrt.

3. Immobilisierte Matrizen (KMnO₄-Footprint, EC20)

Ein 50 µl PCR-Ansatz in 1x Taq-Transkriptionspuffer enthielten 100 ng Plasmid *gdh-C20*, 0.5 mM Primer M13*forward*, 0.5 mM Primer M13*reverse* (einer der beiden Primer biotinyliert), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 3 U Taq DNA-Polymerase. Amplifikation erfolgte durch 1 min 50 sec 95°C, 10x (5 sec 95°C, 30 sec 60°C, 1 min 72°C), 25x (5 sec 95°C, 30 sec 60°C, 1 min+10 sec/Zyklus 72°C), 4°C. Die Bindung von insgesamt 100 µl PCR-Ansatz an 50 µl Streptavidin Magnet-Partikel erfolgte durch i) 3x Waschen der Beads mit Puffer A (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) ii) Resuspension der Beads in Puffer B (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), Zugabe von 50 µl PCR-Reaktion, Schütteln für 30 min bei RT, Waschen mit 90 µl Puffer B, Zugabe von 50 µl PCR-Reaktion, Schütteln für 30 min bei RT, Verwerfen des Überstandes iii) Resuspension der Beads in 90 µl Puffer C (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl), Inkubation für 1 min bei RT, wiederholte Resuspension in Puffer C und Inkubation bei RT, Resuspension in 90 µl TE'. Die Beads wurden im Kühlschrank gelagert.

4. Radioaktiv 5'-endmarkierte EMSA-Matrizen

Die Amplifikation eines Abschnittes des *gdh*-Promotors (Dissertation Souad Naji) erfolgte mittels PCR in 5 Ansätzen in 1x Taq-Puffer bestehend aus 1 µl genomische DNA, je 0.2 mM Primer *gdhFor2* und *gdhRev3*, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U Taq DNA-Polymerase. Amplifikation erfolgte bei 3 min 95°C, 30x (30 sec 95°C, 30 sec 58°C, 30 sec 72°C), 10 min 72°C, 4°C. Das resultierende Produkt hat eine Länge von 97 bp; seine Reinheit wurde auf dem Agarosegel überprüft. Wahlweise wurde Plasmid-DNA (*gdh-C20*) mit M13-Primern

amplifiziert (siehe Herstellung der Standard-Transkriptionsmatrize). Nach Reinigung mittels Qiagen PCR Purification Kit wurde die Konzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt (Nanodrop). Die Markierungsreaktion wurde mit 12.7 pmol DNA Template, 20 U T4 PNK und 1.5 µl [γ - 32 P] ATP mit 0.55 MBq (220TBq/ mmol) in 1x PNK-Buffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 30 min bei 37°C durchgeführt. Es wurden 2 µl 0.2 M EDTA zugegeben, 60 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohl hinzugefügt, 20 sec gevortext, 10 min zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorf Gefäß mit 20 µl 10 M Lithiumchlorid überführt, 2 µg Glykogen und 150 µl 99% Ethanol zugegeben. Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20°C. Es wurde für 30 min abzentrifugiert, das Pellet getrocknet und mit 2 Volumen eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach Resuspension in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8 folgte eine Aufreinigung mit dem Nucleotide Removal Kit.

5. Cy5-markierte EMSA-Matrizen

Die PCR-Reaktion enthielt 25 ng Plasmid *gdh-C20*, je 0.6 mM Cy5-markierten M13*forward*- und nicht markierten M13*reverse*-Primer, 0.2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA-Polymerase in 1x Taq-Buffer. Amplifikation erfolgte durch 2 min 95°C, 25x (30 sec 95°C, 30 sec 50°C, 30 sec 72°C), 4°C. Zwei Ansätze wurden über eine Säule des PCR Purification Kits aufgereinigt, mit insgesamt 80 µl EB Puffer eluiert und am Agarosegel analysiert.

6. APB-derivatisierbare Matrize T25 für die *in vitro* Transkription

Da keine interne radioaktive Markierung notwendig war, wurde die erforderliche Phosphorothioat-Modifikation mittels PCR an einem Plasmid welches den *gdhC20*-Promoter enthält eingeführt. Eine PCR-Reaktion enthielt in 50 µl 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 75 ng Plasmid *gdhC20*, 0.3 µM Primer M13*forward* 5'-biotinyliert, 0.3 µM Primer T25 (Thio-Modifikation an Position 25 des Template-DNA-Stranges), 2 U Taq-Polymerase in 1x Taq-Buffer. Amplifikation erfolgte durch 95°C 3 min, 25x (95°C 5 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec), 72°C 5 min, 15°C. Das PCR-Produkt wurde an Dynabeads M-280 gebunden: von den Beads wurde zuerst der Überstand verworfen, dann das Pellet mit 76 µl PBS und 4 µl BSA (20 mg/µl) gewaschen und in 50 µl TE' 2 M NaCl resuspendiert. 25 µl PCR-Reaktion wurden zugegeben und während 30 min bei 37 °C unter leichtem Schwenken gebunden. Der Überstand wurde verworfen, die Beads mit 50 µl TE' 2 M NaCl gewaschen, und in 50 µl TE' 2 M NaCl resuspendiert. Es wurden noch einmal 25 µl PCR-Reaktion zugegeben und wieder 30 min bei 37°C unter leichtem Schwenken gebunden. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet 1x mit 600 µl und 1x mit 440 µl TE' 1 M NaCl gewaschen. Dann wurde das Pellet 2x mit 440 µl TE' 0.1% BSA gewaschen und in 50 µl TE' 0.1% BSA resuspendiert. Es wurden 32 µl EcoRI-HF Mix zugegeben (27 µl Wasser, 3 µl 10x NEB Buffer 4, 2 µl EcoRI-HF 20 U/µl) und die Mischung für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und das Pellet mit 50 µl TE' gewaschen. Der Überstand wurde ebenfalls gesammelt. Die Überstände wurden phenolisiert, Ethanol-gefällt und in 45 µl TE' resuspendiert. Die eigentliche Derivatisierungsreaktion wird durchgeführt wie in der Dissertation von Sebastian Grünberg beschrieben.

7. Matrizen für den *S. cerevisiae* PIC-Rekrutierungsassay

Die zu immobilisierende Matrize wurde über PCR hergestellt: die Reaktion enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl je 0.5 mM Biotinyl-MSe121 Primer und Cy5-markierten MSe145 Primer, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 30 ng Plasmid pMSe24, 1.25 U Taq DNA-Polymerase in 1x Buffer. Amplifikation wurde erreicht durch 2 min 95°C, 30x (30 sec 95°C,

30 sec 65°C, 1 min 72°C), 2 min 72°C, 8°C. Die PCR Reaktionen wurden 6x angesetzt, über 3 Säulchen des PCR Purification Kit aufgereinigt, phenolisiert, Ethanol-präzipitiert und in 50 µl Tris-HCl pH 8 resuspendiert.

D) Assays

1. *In vitro* Transkription

Transkriptionsreaktionen enthielten 10 nM *gdh*-C20 Matrize, 200 nM TBP, 70 nM TFB, 10 nM RNAP, NTPs (440 µM ATP, 440 µM GTP, 440 µM CTP, 2.7 µM UTP und [α -³²P]-UTP (0.15 MBq, 110 TBq/mmol)) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Wenn nicht anders angegeben, war TB-0 (40 mM HEPES-Na pH 7.3, 250 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM ZnSO₄) mit 5% Glycerol der Transkriptionspuffer. Transkriptionen mit *geschlossenen Matrizen*, *upstream Minibubble* und *Start Minibubble* Templaten enthielten 15 nM Matrize oder 100 ng synthetische Matrizen. Die RNA wurde mittels Phenolisierung extrahiert: 25 µl der Reaktion wurden in 40 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) transferiert, 20 sec gevortext, mindestens 4 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, 18 µl des Überstandes abgenommen und mit 12.5 µl 3x FA-Puffer gemischt. Die Proben wurden denaturiert (3 min 95°C) und 10 µl auf ein 6-8% (Run-Off) oder auf ein 24-28% (kurze Transkripte) PA/ 6 M Harnstoff Gel aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte mit dem Fuji FLA-5000 Phosphorimager.

2. Abortive Transkription

Es wurden dieselben Parameter verwendet wie in der Run-Off Transkription (Templat *gdh*-C20), als Nukleotide wurden aber ausschließlich 40 µM GpU und [α -³²P]-UTP (0.22 MBq (110 TBq/mmol) eingesetzt. Trinukleotide wurden auf einem 28% PA-/ 6 M Harnstoff-Gel analysiert.

3. EC20 und Kinetik der TFS induzierten RNA-Spaltung

EC20-Komplexe wurden in 72 µl Reaktionen für 3 oder 15 min bei 70°C in Transkriptionspuffer (40 mM Hepes-Na pH 7.8, 200 nM NaCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM EDTA, 20 mM DTT, 200 ng/µl BSA) mit 180 nM TBP, 125 nM TFB, 22.7 nM endogener RNAP und Nukleotiden (40 µM ATP, 40 µM GTP, 2.7 µM UTP und [α -³²P]-UTP (0.3 MBq, 110 TBq/mmol) an 3 µl immobilisierter *gdh*C20-Matrize (III.C.3) gestellt. Die Reaktion wurde drei Mal mit dreifachem Reaktionsvolumen Waschpuffer (Transkriptionspuffer ohne BSA) gewaschen, in Waschpuffer resuspendiert und aufgeteilt. TFS-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 211 mM NaCl oder 311 mM NaCl je nach Pool) oder 150 nM TFS wurden entweder sofort, nach 3 oder 15 min fortgesetzter Inkubation ohne Nukleotide bei 70°C zugegeben. Proben zu 6 µl wurden nach den angegebenen Zeitpunkten den Reaktionen entnommen, und mit gleichem Volumen 3x FA-Puffer gemischt. Nach Denaturieren (3 min 95°C) wurden die Proben auf einem 28% PA-/6M Harstoff Gel analysiert.

4. Eisenspaltung in EC20 Komplexen

EC20-Komplexe wurden in 64 µl Reaktionen für 3 min bei 70°C und nach weiterer Inkubation für 2 min in Gegenwart von 400 nM spezifischer *gdh*C5-Kompetitor-DNA in

Transkriptionspuffer wie in Kap. III.D.3 beschrieben gestellt, fünf Mal mit Transkriptionspuffer ohne MgCl_2 gewaschen und für die verschiedenen Reaktionen aufgeteilt. Die Eisenspaltung erfolgt in Gegenwart von 30 mM DTT und 3 mM Ammoniumeisen(II)-sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2)$ in 8 μl für 20 min bei 20°C. Nach Mischen mit gleichem Volumen 3xFA-Puffer und Denaturieren (3 min 95°C) werden die Reaktionen auf einem 28% PA-/6M Harnstoffgel analysiert. Inkubation der gestellten Komplexe nach dem Waschen für weitere 15 min bei 70°C produzierte die gleichen Eisenspaltprodukte (nicht gezeigt).

5. Transkription an APB-derivatisierten Matrizen

EC20 auf APB-derivatisierten Matrizen wurden mit geringfügigen Variationen wie in den photochemischen Crosslinking-Experimenten gestellt (Grünberg et al., 2010): die DNA-Matrize enthält keine radioaktive Markierung (s. III.C.6) und die Nukleotidkonzentrationen waren 40 μM ATP, 40 μM GTP, 2,68 μM UTP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP (0.15 MBq, 110 TBq/mmol). Für Chase-Experimente wurden NTPs (40 μM) oder 150 nM TFS zugegeben und 1 min weiter bei 70°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Transferieren auf Eis und die Zugabe von 3x FA-Buffer gestoppt.

6. KMnO_4 Footprints

Initiationskomplexe wurden in 25 μl Ansätzen in 1x TB-0 mit 200 nM TBP, 70 nM TFB und 75 nM RNAP in Gegenwart von 3 μl immobilisierter Matrize (s. III.C.3) für 5 min bei 70°C assembliert. Es wurden 2.5 μl 250 mM KMnO_4 (RT) zugegeben, weitere 2 min bei 70°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 1.5 μl 2-Mercaptoethanol (RT) und 20 μl vorgewärmten (70°C) Stopp Puffer (125 mM EDTA, 1.25% SDS) angehalten und auf Eis gestellt. Mittels Magnetpartikelseparator wurde der Überstand entfernt, die Partikel in 18 μl Wasser resuspendiert, 2 μl Piperidin zugegeben und für 30 min bei 90°C inkubiert. Die nun freigesetzte DNA im Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Gefäß transferiert und mit 30 μl Wasser verdünnt. Durch Zugabe von 5 μl 3 M Natriumacetat pH 5.2, 20 μg Glykogen und 125 μl 99% eiskaltem Ethanol und Inkubation für 30 min bei -80°C wurde die DNA gefällt. Nach 30 min Zentrifugation wurde das Pellet mit 500 μl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, noch einmal 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mittels SpeedVac (2 min, 45°C) getrocknet und in 10 μl 10 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. Nach Zugabe von 5 μl 3x FA-Puffer wurde für 3 min bei 95°C denaturiert, und die Auftrennung erfolgte auf einem 6% PA-/ 6 M Harnstoff Gel (Biorad Sequenzieranlage).

7. Sequenzierreaktion

In einem 20 μl Ansatz wurden in 30 min bei 37°C 20 pmol M13 Primer in Gegenwart von 4 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP (1.5 MBq, 220 TBq/ mmol) mit 20 U T4 PNK in 1x PNK Puffer markiert. Inaktivierung erfolgte durch Denaturieren für 3 min bei 95°C. Der Mastermix für 4 Reaktionen enthielt 5 μl markierten Primer, 8 μl 10xSequenzier-Puffer, 2 μl Reader Taq, und 1.1 μg DNA. In PCR Reaktionsgefäßen wurden 4 μl A-, T-, C-, oder G- Terminationsmix vorgelegt und dazu 12 μl des Mastermixes gemischt. Die Sequenzierreaktion erfolgte durch 2 min 95°C, 25x (1 min 95°C, 1 min 68°C, 2 min 72°C), 4°C. Pro Gel wurden 1 bis 5 μl aufgetragen. Die Reaktionen wurden bei -20°C aufgehoben.

8. RNA-Spaltung und Elongation an Elongation-Scaffolds

Der Template-DNA Strang, biotinylierter Non-Template-DNA Strang sowie die RNA (Kireeva et al., 2000) wurden über ein denaturierendes Gel aufgereinigt (s. III.A.2). 8 pmol der RNA wurden mit 6.73 pmol [γ - 32 P]-ATP (1.5 MBq, 220 TBq/mmol) in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l in 1x PNK Buffer mit 2 U T4 PNK in 30 min bei 37°C am 5'-Ende radioaktiv markiert. Nach Phenolisieren wird eine Lösung von je 50 nM Template Strang und 5'-markierte RNA in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 hergestellt und diese bei -20°C gelagert. Zu Beginn des Versuchs werden Template-Strang und RNA hybridisiert (5 min 90°C, 5 min 70°C, 15 min 45°C, 15 min 40°C, 15 min 25°C). Es folgt die Bindung von 50 fmol Template+RNA mit 500 fmol RNAP für 5 min bei 25°C, 50 nmol des biotinylierten Non-Template-DNA Stranges für 5 min bei 25°C, 1.25 μ g Heparin für 5 min bei 25°C in 1x Acetatpuffer (100 mM Kaliumacetat pH 7.6, 20 mM HEPES pH 7.6, 1 mM EDTA, 5 mM Magnesiumacetat) in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l. Ein Viertel der Reaktion wurde wie angegeben mit 7 pmol TFS und / oder NTPs (je 40 μ M ATP, GTP, UTP) für 10 min bei 70°C inkubiert. Elongationskomplexe werden 3 Mal mit 25 μ l 1x Acetatpuffer gewaschen, die Beads in 1x FA-Puffer resuspendiert, 3 min denaturiert und der Überstand auf einem 28% Acrylamidgel analysiert.

9. Band Shift Assay (EMSA)

Experimente mit mutanten TFBs wurden mit Cy5-markiertem *gdh*-C20 Template (s. Kap. III.D.5) durchgeführt. Assemblierungsreaktionen wurden in Transkriptionspuffer (40 mM HEPES-Na, pH 7.3, 250 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 5% Glycerol, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT, 0.1mM EDTA) durchgeführt und enthielten 100 nM Matrize, 200 nM TBP, 70 nM TFB und 20 nM endogene RNAP in einem Endvolumen von 25 μ l. Nach 10 min Vorinkubation bei 70°C wurde die Reaktion auf 4°C abgekühlt, 1 μ g dIC wurde als Kompetitor zugefügt und die Inkubation bei 70°C für 15 min fortgesetzt. 17 μ l der Reaktion wurden auf ein 4.5% PA/ 2% Glycerol/ TBE Gel aufgetragen. Laufpuffer war TBE+2% Glycerol. Rekonstituierte RNAPs wurden mit geringen Änderungen nach dem selben Protokoll im Band Shift getestet: die Inkubation erfolgte bei 37°C, an einem radioaktiv markierten Template (s. Kap. III.D.4). Mittels peristaltischer Pumpe wurde während des Gellaufs kontinuierlich der Puffer des oberen und unteren Tanks ausgetauscht.

10. *S. cerevisiae* PIC-Rekrutierungsassay

Der Versuch wurde leicht modifiziert nach Angaben auf S. Hahns Webseite durchgeführt (<http://labs.fhcrc.org/hahn/index.html>). Dynabeads (10 mg/ml) wurden zwei Mal mit 400 μ l Puffer A (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) gewaschen, im ursprünglichen Volumen resuspendiert, 0.1% NP40 (Endkonzentration 0.003%), 8.5 ng Promotermatrize pro μ g Beads und ein Fünftel des Volumens der Promoter-DNA 5 M NaCl zugegeben. Die Beads wurden 30 min bei RT inkubiert, mit 400 μ l Puffer A gewaschen und in 1 μ l pro μ g Beads Blockierpuffer (100 mM KAc, 20 mM HEPES-KOH pH 8, 1 mM EDTA, 5 mM Magnesiumacetat, 60 mg/ml Casein, 5 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 2.5 mM DTT) resuspendiert. Während der 15 minütigen Inkubation wurden die Beads mehrmals resuspendiert, drei Mal mit 400 μ l Waschpuffer (100 mM KAc, 20 mM HEPES-KOH pH 8, 1 mM EDTA, 5 mM MgAcetat, 0.05% NP-40, 2.5 mM DTT) gewaschen und schließlich im ursprünglichen Volumen resuspendiert. Es wurde mit 730 ng Gal4-VP16 Aktivator für 10 min bei RT inkubiert und dabei zwischendurch vorsichtig gemischt.

Die PIC-Assemblierung wurde in 1x Transkriptionspuffer mit 64 mg/ml Phosphokreatin, 2.5 mM DTT, 400 ng CPK, 0.05% NP40 angesetzt und enthielt 360 µg nuklearen Extrakt oder Puffer HA+K (20mM HEPES pH 7.9, 10% Glycerol, 1 mM EDTA, 100 mM KAc, 1 mM DTT), 800 ng TFIIB, 1 µg *HaeIII* verdaute *E. coli* DNA und 5 µl Bead-gebundene DNA mit oder ohne Aktivator. Bevor Beads, Transkriptionsfaktoren und *E. coli*-DNA zugegeben wurden, wurde der nukleare Extrakt 10 min bei RT inkubiert, 2 min bei 9 000 rpm, 4°C abzentrifugiert und nur der Überstand für die eigentliche Assemblierungsreaktion (40 min, 20°C) verwendet. Von Zeit zu Zeit wurden die Reaktionen resuspendiert, um Absetzen der Beads zu verhindern. Zuletzt wurden die Beads 1 min in 1x Proteinauftragspuffer bei 95°C erhitzt und der Überstand mittels Magnetpartikelseparator auf ein 4-20% Gradientengel (Invitrogen) geladen.

Western Blotting wurde mittels Wet-Blot-Kammer (Biorad) auf eine PVDF-Membran mit frischem Transfer Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Trisbase, 20% Ethanol) für 70-75 min bei 100 V (auf Eis) oder über Nacht bei 25 V (4°C-Raum) durchgeführt. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4°C oder 1 h schüttelnd in Milch (2% Milchpulver in 1x PBS) bei RT blockiert. Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1 h bei RT in einer Petrischale. Es wurde drei mal 10 min mit Milch gewaschen, 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert, drei mal 10 min mit 1xPBS gewaschen und dann das Ergebnis mittels Typhoon 400 scanner (GE healthcare) ausgelesen.

Antikörper:	α-TBP-AK:	1: 2 000, mouse (Sigma T1827, clone58c9)	
	α-Sua7p-AK:	1: 5 000, rabbit (Abcam ab63909)	
	α-Rpb1-AK:	1: 500, mouse	
	α-mouse AK:	1: 5 000, Alexa-488	→ Filter 520BP40 Cy2 ECL+, Blue Fam
	α-rabbit AK:	1: 5 000, Alexa-633	→ Filter 670BP30 Cy5

11. In vitro Transkription mit nuklearem Extrakt von *S. cerevisiae*

Die Reaktionen wurde nach (Ranish et al., 1999) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Das 25 µl Reaktionsvolumen enthielt 20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM Kaliumacetat, 1 mM EDTA, 5 mM Magnesiumacetat, 2.5 mM DTT, 192 µg Phosphokreatin, 200 ng Kreatinphosphokinase, 150 ng Plasmid-Matrize, 10 U RNase Inhibitor, 0.4 mM NTPs, 24 ng Gal4-VP16, 100 µg nuklearen Extrakt und wie in den Abbildungen beschrieben verschiedene Mengen an rekombinantem TFIIB. Die Reaktion wurde nach 10 min Assemblierung des Gal4-VP16-Aktivators an die DNA bei Raumtemperatur durch Zugabe von nuklearem Extrakt und/oder NTPs gestartet und für 30-45 min bei 20°C durchgeführt. Es wurden 180 µl Stopp Mix (100 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 85 µg tRNA) zugegeben, gevortext und die Nukleinsäuren durch Phenolisierung extrahiert: 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zugegeben, 1 min gevortext, für 10 min zentrifugiert, 180 µl Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf Gefäß transferiert. Es folgte Präzipitation durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat, 380 µl eiskaltem 99% Ethanol und Inkubation auf Trockeneis für 15 min. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C wurde das Pellet einmal mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, in der SpeedVac getrocknet (2 min mit Heizung) und durch Vortexen in 10 µl Primer Annealing Mix (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 5 mM EDTA, 0.015 µM Cy5-/FAM-markierter Primer (5'-ttcaccagtggagacgggcaac-3') resuspendiert. Die Ansätze wurden 1 min im 95°C-Heizblock denaturiert, sofort in einen 48°C-Heizblock transferiert und für 45 min hybridisiert. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert, mit 20 µl Synthese Mix (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂, 15 mM DTT, 0.15 mM dNTPs, 100 U H Minus M-MuLV Reverse

Transkriptase) gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 3 µl 3 M Natriumacetat und 90 µl 99% Ethanol sowie Inkubation für 20 min auf Trockeneis wurde die Nukleinsäure gefällt. Nach 10 min Zentrifugation wurde das Pellet mit 100 µl eiskaltem 80% Ethanol gewaschen und anschließend in der SpeedVac (2 min mit Heizung) getrocknet. Es wurde in 3 µl RNaseA (100 mg/ml) resuspendiert, für 3 min bei RT inkubiert, 3 µl 3x FA-Puffer zugegeben, 1 min bei 95°C denaturiert und der gesamte Ansatz auf ein 8% FQP gel geladen.

50x FQP-Puffer: 166.7 mM Bis-Tris, 280.1 mM Tricin, 3.29 mM EDTA, pH 7.5 mit NaOH einstellen, Lagerung 4°C. Puffer oben: 5x FQP; Puffer unten: 1x FQP.

8% Gellösung: Rotiphorese Non Fluorescent (19:1), 1x FQP Buffer, 6 M Harnstoff; filtrieren, Lagerung dunkel/RT.

12. Bestimmung der *in vitro* Transkriptionsstarts von *S. cerevisiae*

Die Dideoxy-Sequenzierleiter wurde mit dem für die Primer Extension Reaktion verwendeten Primer mittels Sequencing Kit (USB) nach verändertem Herstellerprotokoll generiert. Plasmid pMSe24 oder pSH515 wurde mit *PstI* geschnitten und über PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Reaktion wurde in Thermo Sequenase Buffer in einem Gesamtvolumen von 8 µl durchgeführt und enthielt 125 ng *PstI*-verdautes Plasmid, 2.5 pmol Cy5-markierten Primer, 78 nM dNTP mix (je 70 nM dATP, dCTP, dTTP und 7-deaza dGTP), 50% Termination Mix A/C/G oder T, 0.5 µl Thermo Sequenase DNA-Polymerase. Die Reaktionszyklen waren: 2 min 92°C, 50x (30 sec 92°C, 30 sec 65°C, 30 sec 72°C), 12°C. Nach der Reaktion wurden 8 µl FA-Auftragspuffer (ohne Farbstoffe) zugegeben, die Proben für 3 min bei 92°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Von diesen Proben wurden 2 bis 5 µl auf ein 8% PA/ 6 M Harnstoff Gel (Biorad-Sequenzieranlage) aufgetragen. Die Ergebnisse wurden auf einem Typhoon 400 scanner (GE healthcare; Filter: 670BP30 Cy5) ausgelesen.

IV) Ergebnisse

Dieses Kapitel ist in zwei größere Abschnitte unterteilt. Zunächst werden die Ergebnisse der Untersuchungen zum Mechanismus der Transkriptionsinitiation bei *P. furiosus* und *S. cerevisiae* dargestellt. Es folgen die Resultate der Analyse von *Backtracking* bei gestellten Elongationskomplexen von *P. furiosus*.

A) Mechanismus der Transkriptionsinitiation

Ausgehend von einer neuen Röntgenkristallstruktur der Pol II mit TFIIB von *S. cerevisiae* aus dem Labor von P. Cramer (Genzentrum, LMU München) werden zunächst einzelne Strukturbereiche des *P. furiosus* TFB durch Mutagenese charakterisiert. In der zweiten Mutationsanalyserunde werden neu entdeckte funktionelle Elemente in TFB im Detail untersucht. Zudem wird ein Bereich der *Clamp* (Coiled-Coil α -Helices $\alpha 8$ und $\alpha 9$ der Untereinheit A' bzw. Rpb1 in *S. cerevisiae*) der *P. furiosus* RNAP mutiert um eine mögliche Interaktion mit TFB nachzuweisen. Die Ergebnisse aus dem archaeellen System werden durch die *in vivo* und *in vitro* Untersuchung entsprechender TF(II)B Mutanten von *S. cerevisiae* komplettiert.

1. Eine neue, zunächst noch unvollständig gelöste Kristallstruktur von Pol-II mit TFIIB aus *S. cerevisiae*

Bis heute ist es nicht gelungen, TF(II)B als Gesamtprotein zu kristallisieren. Man kennt jedoch die Struktur des C-terminalen *Core*-Bereiches (Bagby et al., 1995; Nikolov et al., 1995; Kosa et al., 1997; Littlefield et al., 1999) sowie die Struktur des N-terminale sogenannte *Zinc-Ribbons* (*Zn-Ribbon*) aus unterschiedlichen Organismen (Zhu et al., 1996; Chen et al., 2000; Ghosh et al., 2004) (s. Einleitung, Abb. 3). Darüber hinaus wurde eine Co-Kristallstruktur der Pol II mit TFIIB von Hefe publiziert, in der eine sogenannte *B-Finger* Schleife zu sehen ist, die bis hin zum aktiven Zentrum der RNAP ragt (Bushnell et al., 2004).

In der Arbeitsgruppe von P. Cramer ist es ebenfalls gelungen, einen Co-Kristall der Pol II mit TFIIB aus Hefe herzustellen, der mit den zu Beginn meiner Arbeit zur Verfügung stehenden bioinformatischen Mitteln jedoch nicht vollständig gelöst werden konnte. Insbesondere der Bereich von TFIIB, welcher in die DNA-bindende Spalte (*Cleft*) der RNAP reicht, war nicht aufzuklären. Im ersten Durchgang der TFB Mutationsanalyse wurde die Existenz des *B-Fingers* daher nicht angezweifelt.

Besondere Beachtung zu Beginn der Strukturanalyse erhielt eine längliche Elektronendichte in der *Cleft* der RNAP, welche weder dem *Core* von TFIIB noch Pol II zugeordnet werden konnte (Abb. 10). Folglich entstammte diese mit großer Wahrscheinlichkeit dem *Linker* von TFIIB. Der Bereich ist sehr nahe an einem *Coiled-Coil* der *Clamp* ($\alpha 8$ und $\alpha 9$ von Rpb1) gelegen, welche einen Teil der Oberfläche der DNA-bindenden Spalte bildet.

Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welches der beiden vorgeschlagenen Modelle für den Initiationskomplex korrekt ist (Bushnell et al., 2004; Chen und Hahn, 2004) (s. Einleitung Abb. 4). Sollte die Elektronendichte tatsächlich dem *Linker*-Bereich von TFIIB entsprechen, hätte dies die Protein-Protein-*Crosslinking* Daten und damit das Modell von (Chen und Hahn, 2004) betätigt. Da die Strukturbiochemie hier an ihre Grenzen geraten ist, sollten biochemischen Arbeiten zur Klärung dieser Fragenstellungen beitragen.

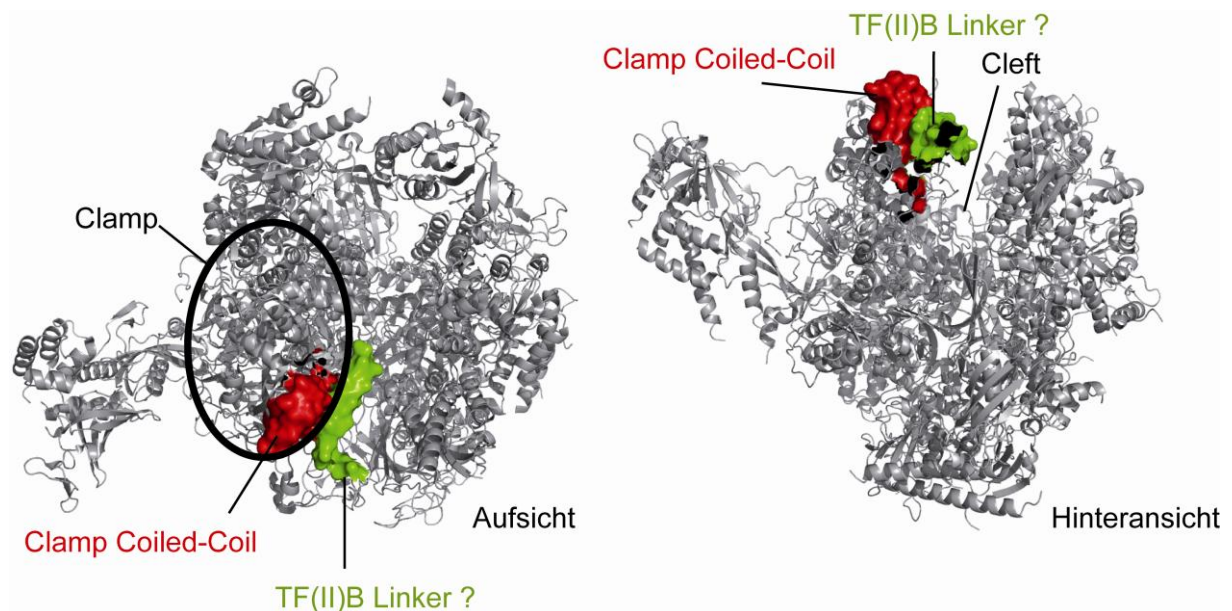


Abb. 10. Vermutete Position des TF(II)B-Linkers. Die Position der *Clamp Coiled-Coil* Domäne (rot, α -Helices $\alpha 8$ und $\alpha 9$ von Rpb1, *surface*) der RNAP (silber, *cartoon*) mit der zunächst fraglichen Elektronendichte (grün, *surface*) ist dargestellt. Die Abbildung wurde mittels PyMOL (PDB 3KF1, (Kostrewa et al., 2009)) erstellt.

2. Mutanten-Design und bioinformatische Untersuchung archaeeeller TFBs

Der Durchmesser der ungeklärten Elektronendichte in der DNA-bindenden Spalte der RNAP deutet auf eine mobile α -Helix hin. Tatsächlich ermittelt eine Sekundärstruktur-Vorhersage von *S. cerevisiae* TFIIB mit PSIPRED (Jones, 1999) einen α -helikalen Abschnitt am C-terminalen Ende des *Linkers* (Abb. 11c).

Eine tiefergehende Untersuchung mit Vertretern archaeeeller TFBs aus allen bis dato sequenzierten Genomen sowie dem humanen TFIIB ergibt, dass eine α -Helix im *Linker* aller TF(II)Bs vorhergesagt wird, auch wenn die Primärstruktur nicht gut konserviert ist.

Ausgewählte Sequenzen dieses Alignments sind in Abb. 11 c gezeigt. Es fällt auf, dass die *Linker*-Helix Vorhersage auch auf alle TFB2 Sequenzen zutrifft, sowie auf die TFBs von *A. pernix* oder *N. equitans*, deren Aminosäuresequenz besonders stark vom TFB-Konsensus abweicht (nicht gezeigt).

Die Hinweise auf eine α -Helix im TFB-*Linker* sind insofern überraschend, als dass dieser Bereich bislang als unstrukturierte, flexible Verbindung zwischen den N-terminalen und C-terminalen funktionellen Domänen angesehen wurde. Das Vorliegen einer Sekundärstruktur deutet darüber hinaus auf eine mögliche funktionelle Aufgabe hin.

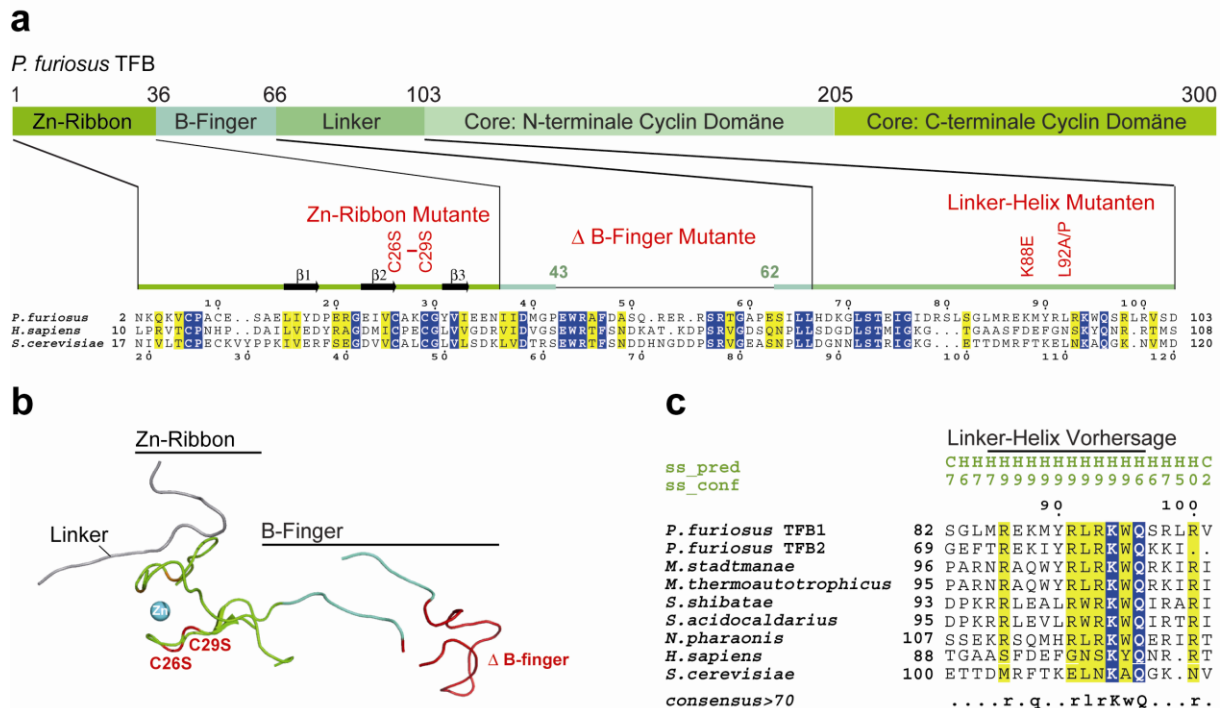


Abb. 11. Design des ersten Mutantensets von *P. furiosus* TFB. (a) Darstellung der in der ersten Analyserunde untersuchten Mutationen in *P. furiosus* TFB, wobei die Primärstruktur von TFB1 aus *P. furiosus* mit den zu Beginn der Arbeit charakterisierten strukturell-funktionellen Elementen abgebildet ist. (b) Lokalisierung der Mutationen im *Zn-Ribbon* und *B-Finger* in der Struktur von (Bushnell et al., 2004) (PDB 1R5U). (c) Ausschnitt des TFB Alignments und Vorhersage der α -Helix im *Linker* ausgewählter TF(II)B Sequenzen mit PSIPRED (Jones, 1999). Die Sequenzalignments wurde mittels MUSCLE (Edgar, 2004) erstellt, manuell bearbeitet und mit ESPRIPT (Gouet et al., 1999) dargestellt. Vollständig konservierte Aminosäuren sind dunkelblau, ähnliche Aminosäuren gelb unterlegt.

Basierend auf diesen Vorhersagen wird in der putativen *Linker*-Helix eine Ladungsumkehr Mutation (K88E), eine Helix-Brecher Mutation an einem konservierten Leucin (L92P) sowie eine weniger schwerwiegende Alanin-Substitution an derselben Stelle (L92A) eingeführt. Zusätzlich wird der *B-Finger* Bereich fast vollständig deletiert. Zur Überprüfung der Kongruenz des *P. furiosus* Systems mit dem anderer Organismen wird darüber hinaus die Struktur des *Zn-Ribbons* destabilisiert, indem zwei der vier Zinkkoordinierenden Cysteine zu Serinen mutiert werden (C26S, C28S). Diese Mutante sollte einen Defekt bei der Bindung der RNAP aufweisen (Bell und Jackson, 2000). Abb. 11 a und b geben einen Überblick über diese Mutationen.

3. Erster TFB Mutanten-Satz

Aufreinigung der TFB-Mutanten und Bindung der RNAP an den Promotor

Die Aufreinigung von *P. furiosus* TFB mit N-terminalem His₆-Tag erfolgt in zwei Schritten mittels NiNTA-Säule und Gelfiltration, wobei alle Mutanten vergleichbare Elutionsprofile aufweisen (nicht gezeigt). Unlöslichkeit einzelner Mutanten kann daher ausgeschlossen werden. Im Vergleich von wildtypischem mit mutanten TFBs auf einem SDS-Gel ist zu sehen, dass die *Zn-Ribbon* Mutante ein etwas langsames Laufverhalten aufweist, während die *B-Finger* Deletionsmutante wie erwartet eine schnellere elektrophoretische Mobilität besitzt (Abb. 12a, Spur 2 und 4).

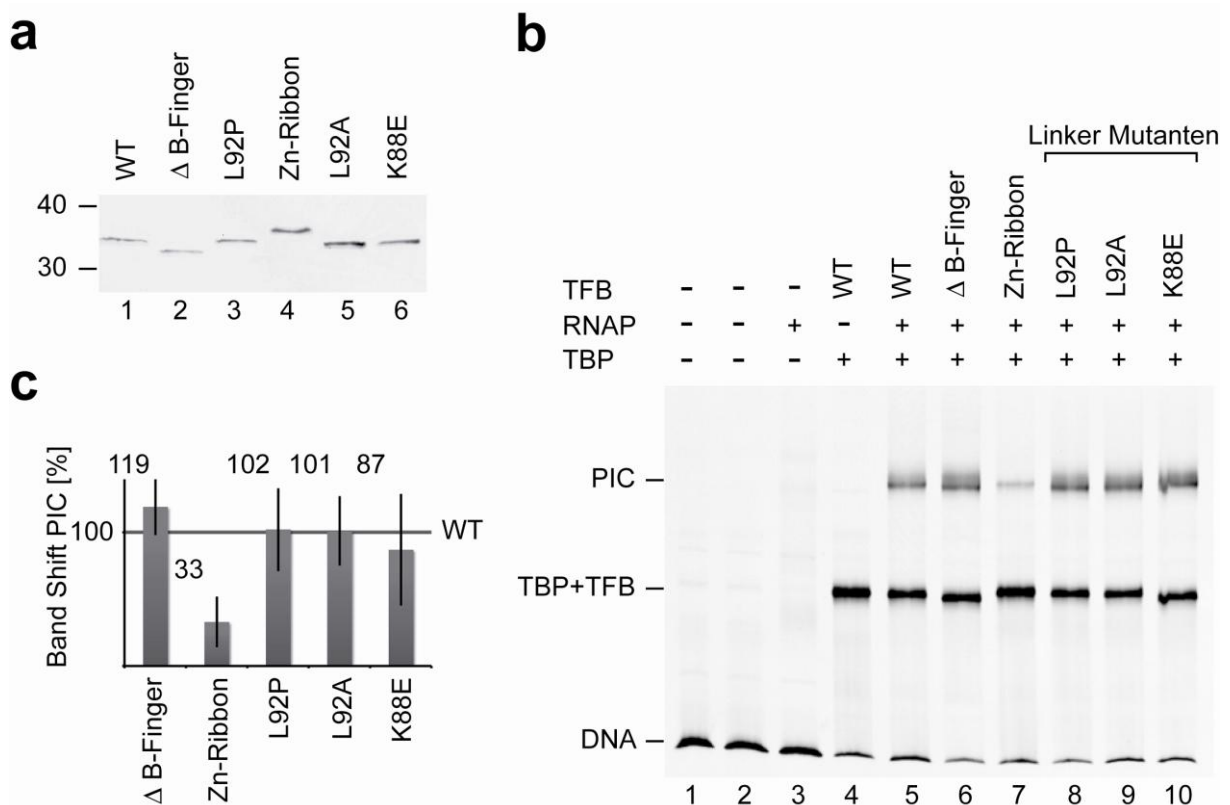


Abb. 12. Ausbildung von Initiationskomplexen mit mutanten *P. furiosus* TFBs. (a) Analyse rekombinanter TFB-Mutanten am 12% SDS-Polyacrylamidgel. In Spur4 ist die abweichende Mobilität der *Zn-Ribbon* Mutante zu sehen. Links des Gels sind die Laufweiten des Proteinstandards in kDa angegeben. (b) *Band Shift Assay* mit mutanten TFBs. Am *gdh*-Promotor (DNA) kann spezifisch die Bindung von TFB und TPB (TPB+TFB) sowie von TFB, TBP und RNAP (PIC) nachgewiesen werden. (c) Quantifizierung der PIC-Shifts.

Um zu überprüfen, ob alle TFB-Mutanten in der Lage sind Initiationskomplexe zu bilden werden sie im *Band Shift Assay* getestet. Dabei wird der Initiationskomplex bestehend aus TBP, TFB und RNAP an einer Cy5-endmarkierten DNA Matrize welche die *gdhC20*-Promotor-Sequenz enthält assembliert, und die Komplexe in einem nativen Gel aufgetrennt.

Die Mobilität der DNA-TBP-TFB Komplexe weist die bereits im SDS-Gel beobachteten Abweichungen vom Wildtyp auf (vgl. Abb. 12a und 12b). Die *Zn-Ribbon* Mutante bindet wie erwartet weniger RNAP (ca. 30% im Vergleich zum Wildtyp) und bestätigt damit die Kongruenz unseres Systems mit dem anderer Archaeen und Eukaryoten (Buratowski und Zhou, 1993; Ha et al., 1993; Bell und Jackson, 2000). Deletion des *B-Fingers* sowie die Mutationen in der *Linker-Helix* beeinträchtigen die Assoziation der RNAP nicht.

Die *Linker helix* von TFB ist essentiell für die Aktivität der RNAP.

Mittels Run-Off Transkription kann die Aktivität der RNAP bestimmt werden. Da die Transkriptionsinitiation den zeitlimitierenden Schritt darstellt, kann indirekt über die Menge an synthetisierter RNA auf die Funktionsfähigkeit von TFB geschlossen werden.

Die Run-Off Aktivität mit wildtypischem und mutanten TFBs wird sowohl durch Deletion des *B-Fingers* als auch durch Brechen der *Linker-Helix* (L92P) zerstört (Abb. 13a). Die Alanin-Substitution an L92 sowie die Ladungsumkehr-Mutante K88E lassen hingegen noch vermindert Run-Off Aktivität zu (ca. 35%). Dieses Ergebnis lässt bereits auf eine entscheidende Rolle der *Linker helix* von TFB schließen.

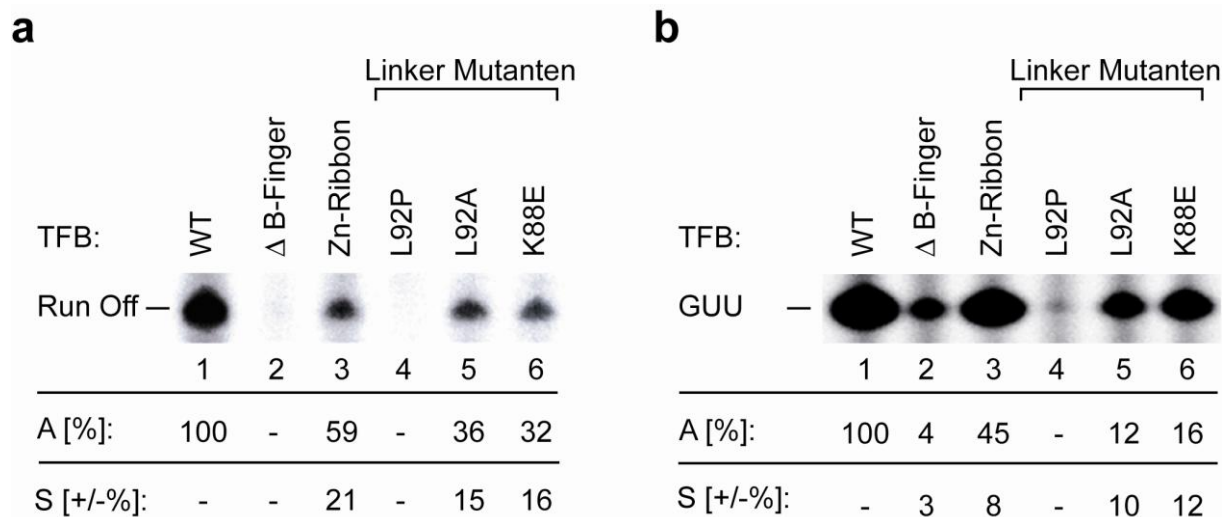


Abb. 13. Transkriptionsaktivität mit mutanten TFBs. Unter den Spuren ist die Quantifizierung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. **(a)** Run-Off Transkription am *gdhC20*-Promotor ergibt eine 113 nt lange RNA (Run-Off). **(b)** Abortiver Test am *gdhC20*-Promotor. Durch promotor-spezifische Elongation des Dinukleotids GpU mit [α - 32 P]-UTP entsteht das Trinukleotid GUU.

Ob sich die TFB-Mutationen bereits bei der Bildung der ersten Nukleotide oder erst nach dem *Promoter Escape* auswirken kann mit Hilfe des abortiven Tests unterschieden werden. Die Transkriptionsreaktion wird mit einem Dinukleotid GpU gestartet, welches komplementär zu Position -1/+1 ist und aufgrund dieser Basenpaarung Initiationskomplexe stabilisieren kann. Der Test ist äußerst sensitiv, da ausschließlich radioaktiv markiertes UTP in der Reaktion vorhanden ist. Promotor-spezifisch wird an das Dinukleotid ein [α - 32 P]-UTP gekoppelt, wodurch theoretisch jedes gebildete Trinukleotid radioaktiv markiert wird.

Wie Abb. 13b illustriert, kann von Initiationskomplexen mit der L92P Mutante kein Trinukleotid synthetisiert werden, während mit der Δ B-Finger Mutante eine geringe Aktivität nachweisbar ist. Quantifizierung des Run-Off und abortivem Test ergibt, dass die Aktivität mit der *Zn-Ribbon* Mutante sowie mit den L92A und K88E *Linker* Mutanten gegenüber dem Wildtyp etwas geringer ist. Dies deutet darauf hin, dass die im Run-Off Test beobachteten Effekte nicht auf einen Defekt im *Promoter Escape* zurückzuführen sind, sondern in einem frühen Stadium der Initiation begründet liegen.

Die *Linker helix* von TFB ist für das Promotor-Öffnen essentiell

Mittels Kaliumpermanganat (KMnO₄)-Footprint kann der Öffnungszustand der Promotor DNA getestet werden: es kommt zu Modifikation und Spaltung an Thyminresten in einzelsträngiger DNA. Durch zusätzliches Auftragen einer Dideoxysequenzierleiter auf ein Sequenziergel kann exakt festgestellt werden, welcher Abschnitt des Promotors geringstenfalls geöffnet ist. Am *gdhC20*-Promotor ergibt dies für den nichttranskribierten Strang einen eindeutig nachweisbaren Öffnungsbereich von Position -6 bis +3, für den transkribierten Strang von Position -8/-9 bis -3, jeweils relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1 (nicht gezeigt und Spitalny und Thomm, 2003).

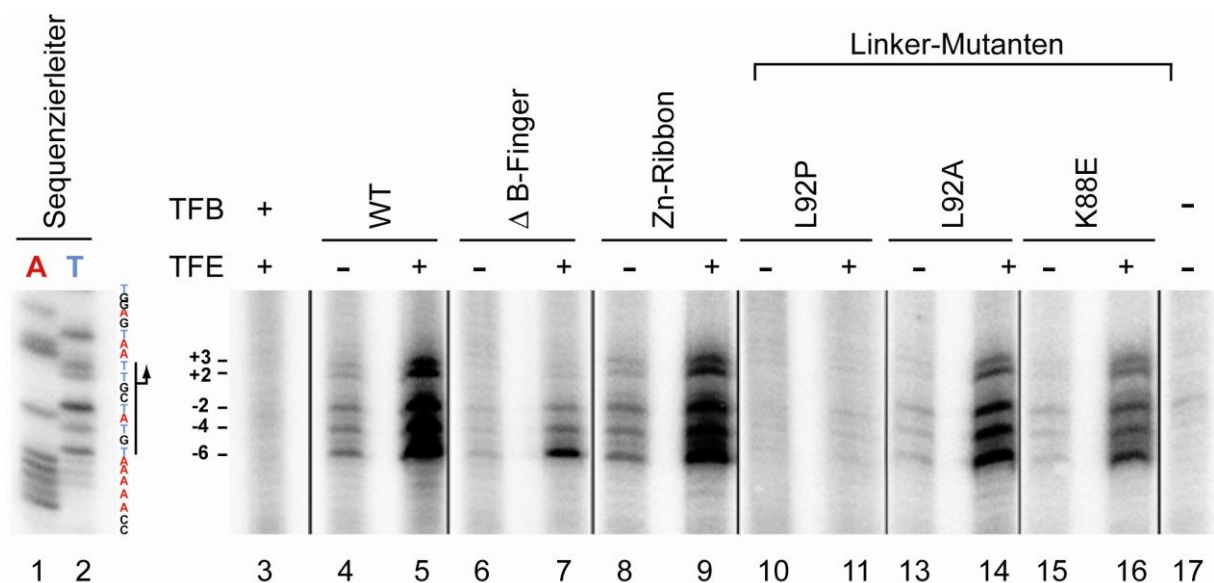


Abb. 14. KMnO₄-Footprint mit mutierten TFBs. Gezeigt ist die Promotoröffnung am nicht-kodierenden Strang des *gdhC20*-Promotors. Spuren 1 und 2 zeigen die Sequenzierleiter für Adenin (A) und Thymin (T). Die vollständige Sequenz ist rechts daneben dargestellt, der Balken zeigt den im PIC geöffneten Bereich, der Pfeil den Transkriptionsstart. Spuren 3-17 enthalten die KMnO₄-Footprints in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von TFE bei Verwendung der jeweils angegebenen TFB Mutante. Die Beschriftung der Banden gibt die jeweilige Position relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1 an. Bis auf in Spur 3 und Spur 17 gezeigten Kontrollexperimente enthielten alle anderen Ansätze TBP und RNAP.

Die Versuche werden in Abwesenheit und Gegenwart von Transkriptionsfaktor E (TFE) durchgeführt. TFE ist bekannt dafür, Defekte von *B-Finger* Mutanten zumindest partiell zu kompensieren (Werner und Weinzierl, 2005). Außerdem wissen wir aufgrund von *Crosslinking*-Versuchen, dass sich TFE in unmittelbarer Nähe des nicht transkribierten

Stranges bei Position -9 befindet, und dass TFE den offenen Komplex stabilisiert (Grünberg et al., 2007).

Die *Zn-Ribbon* Mutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp keinen Defekt in der Promotoröffnung (Abb. 14, Spur 8 und 9). Eine Erklärung wäre, dass die ineffiziente RNAP-Bindung der *Zn-Ribbon* Mutante durch den relativ langen Zeitraum zur Initiationskomplexbildung von 5 min ausgeglichen wird, also zum Zeitpunkt der KMnO_4 -Zugabe gleich viele Initiationskomplexe vorliegen wie beim Wildtyp. Es ist auch denkbar, dass der RNAP-Bindungsdefekt in dieser Reaktion nicht zum Tragen kommt, da die Initiationskomplexe keiner Gelelektrophorese unterworfen sind. Dies würde in Verbindung mit der verminderten Run-Off und abortiven Aktivität auf eine Funktion des *Zn-Ribbons* im Anschluss an die Assoziation der RNAP an Promotor deuten. Mit Sicherheit kann jedoch gesagt werden, dass der *Zn-Ribbon* nicht maßgeblich an der Promotoröffnung beteiligt ist.

Initiationskomplexe, die mit der *B-Finger* Deletionsmutante gebildet werden, können die Promotor-DNA nur zu geringem Ausmaß öffnen. Die Zugabe von TFE kann diesen Defekt teilweise aufheben (Abb. 14, Spur 6 und 7). Interessanter Weise ist der Promotor in Gegenwart von TFE jedoch nur im stromaufwärts Bereich (Position -6 bis -2) aufgeschmolzen, am Transkriptionsstartpunkt bleibt die DNA geschlossen (Position +2 bis +3).

Im Gegensatz dazu kann in Initiationskomplexen mit der L92P Mutante der Promotor auch in Gegenwart von TFE nicht geöffnet werden (Abb. 14, Spuren 10 und 11). Die beiden anderen *Linker*-Mutanten L92A und K88E erlauben noch Promotoröffnung, die aber - passend zu den Ergebnissen von Run-Off sowie abortivem Test - gegenüber dem Wildtyp verringert ist. Die Öffnung am stromabwärts Ende der Transkriptionsblase ist nicht beeinträchtigt.

Die Versuche vermitteln in der Zusammenschau eine Reihe an neuen Erkenntnissen sowohl über TFB als auch TFE: i) das *Linker* Element von TFB stellt einen neuen, eigenständigen funktionellen Bereich dar, der für die Promotoröffnung essentiell ist ii) TFE kann nur wirksam werden, wenn die DNA zumindest geringfügig aufgeschmolzen ist. TFE nimmt daher selbst nicht aktiv am Promotoröffnungsprozess teil sondern spielt erst eine Rolle wenn die Promotor-DNA bereits geöffnet ist. Wahrscheinlich geschieht dies durch die Bindung des einzelsträngigen Non-Template-Stranges am stromaufwärts Ende der Transkriptionsblase (Grünberg et al., 2007). iii) der *B-Finger* ist nicht am Promotor-Öffnen beteiligt, sondern wird für die Stabilisierung des offenen Komplexes benötigt. Es liegt nahe anzunehmen, dass diese Stabilisierung über direkte oder indirekte Interaktion mit dem kodogenen Strang am aktiven Zentrum gewährleistet wird. Fehlt der *B-Finger* wird die Blase zwar durch den *Linker* geöffnet, kollabiert aber immer wieder, weshalb zum einen ohne TFE kein Footprint zu sehen ist und zum anderen noch geringe Aktivität im abortiven Test nachweisbar ist. Zugabe des Dinukleotids GU in die KMnO_4 -Footprint-Reaktion jedenfalls kann die Transkriptionsblase im Bereich +2/+3 nicht stabilisieren (nicht gezeigt).

4. Die fertiggestellte Struktur des Pol II-TFIIB Cokristalls und Design neuer TF(II)B Mutanten

Im Laufe meiner Doktorarbeit ist es dem Labor von P. Cramer schließlich gelungen, die Struktur des Pol II - TFIIB Co-Kristalls weitestgehend zu lösen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden das Endergebnis der Struktur präsentiert, die sich dynamisch durch Verknüpfung von biochemischen Daten und immer aufwendigeren Nachberechnungen der Struktur ergab (Details in *Supplementary Information* (Kostrewa et al., 2009)). Zuletzt beträgt die Auflösung 4.3 Å, ab R84 des *S. cerevisiae* TFIIB (N63 in *P. furiosus* TFB) ist die Struktur mit Polyalanin modelliert, da die Elektronendichtedaten keine

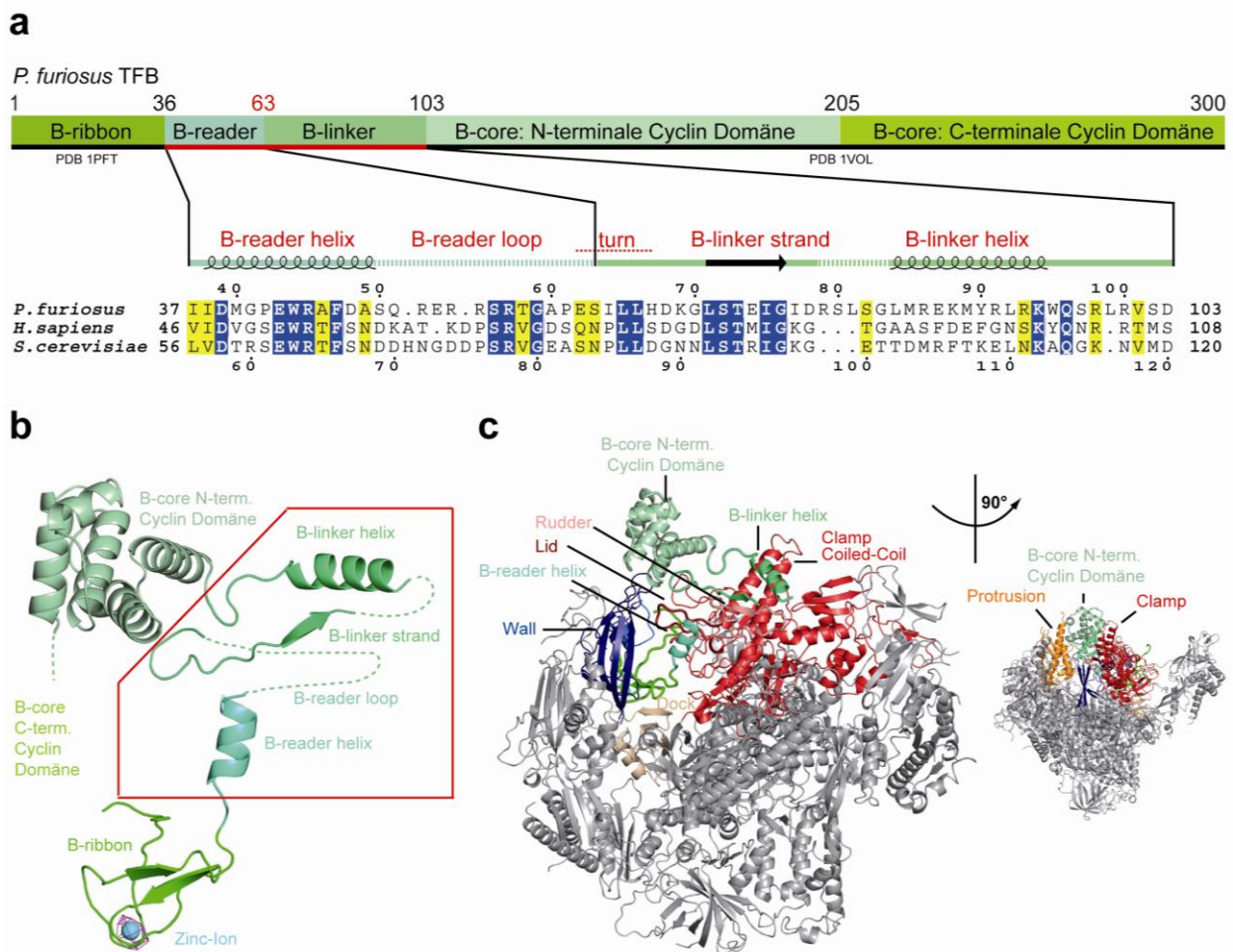


Abb. 15. Die Struktur von TFIIB im Komplex mit Pol II von *S. cerevisiae*. (a) Primärstruktur und Neubenennung einzelner Elemente von TF(II)B. Die Domänengrenzen beziehen sich auf TFB1 von *P. furiosus*. Die bereits aufgelösten Strukturbereiche des B-ribbons (PDB 1PFT (Zhu et al., 1996)) und des B-cores (PDB 1VOL (Nikolov et al., 1995)) sind als schwarze Balken eingezeichnet. B-reader und B-linker werden in dieser Strukturanalyse erstmals beschrieben, und sind durch den roten Balken markiert. Das darunter gezeigte Sequenzalignment wurde mit MUSCLE (Edgar, 2004) angefertigt und nach manueller Nachbearbeitung durch ESPRIPT (Gouet et al., 1999) dargestellt. Konservierte Positionen sind dunkelblau, ähnliche Aminosäuren gelb unterlegt. (b) Struktur von TFIIB. Rot eingekreist sind B-reader und B-linker. (c) Seitenansicht (links) und Vorderansicht (rechts) der TFIIB-Struktur im Pol II Kontext. B-reader und B-linker inserieren in der Cleft; aus Darstellungsgründen sind daher Teile von Rpb2 (Lobe, Protrusion) in der Seitenansicht nicht gezeigt. Die Abb. stammt leicht modifiziert aus (Kostrewa et al., 2009).

Seitenketten erkennen lässt (Abb. 15). Die C-terminale Cyclin Domäne von TFIIB ist nicht zu erkennen.

Es stellt sich heraus, dass die bislang vorgeschlagene Struktur des *B-Fingers* (Bushnell et al., 2004) nicht existiert. Die strukturellen Elemente von TF(II)B werden nun mit vorangestelltem B bezeichnet, und lauten vom N- zum C-Terminus: *B-ribbon*, *B-reader*, *B-linker* und *B-core* bestehend aus N- und C- terminaler *Cyclin*-Domäne. Der *B-Finger* Bereich ist also in *B-reader* umbenannt, um seiner funktionellen Rolle in der Startstellen Selektion in Eukaryoten Rechnung zu tragen. Außerdem ist die Grenze zum *B-linker* entsprechend der neuen Daten verschoben (N84 anstelle von L87 in *S. cerevisiae* TFIIB, S63 anstelle von L66 in *P. furiosus* TFB).

Der *B-reader* besteht aus einer α -Helix (*B-reader helix*), gefolgt von einem ungeordneten Loop (*B-reader loop*). Die Struktur ist wieder aufgelöst ab einem Turn (*B-linker turn*), welcher die Grenze zum *B-linker* markiert. Der *B-linker* setzt sich fort mit einem kurzen β -Strang (*B-linker strand*) welcher ein paralleles β -Faltblatt mit *Rudder* bildet. Es folgt ein kurzer, ungeordneter Abschnitt der in die nun eindeutig erkennbare *B-linker helix* übergeht, welche etwa parallel zum *B-linker strand* verläuft und direkt am *Clamp Coiled-Coil* von Rpb1 vorbei führt. In der Struktur ist außerdem die N-terminale *Cyclin*-Domäne des *B-cores* aufgelöst (s. Abb 15b).

Aus einer Kombination dieser mit bekannten Strukturen (Nikolov et al., 1995; Kettenberger et al., 2004) wurde von den Strukturbiologen der geschlossene und offene Initiationskomplex bestehend aus DNA, TBP, TFIIB, und Pol II modelliert (Abb. 16). Die Position der C-terminalen *B-core Cyclin* Domäne führt zu einem Model welches dem Vorschlag von (Chen & Hahn, 2004) sehr ähnlich ist: die DNA läuft im geschlossenen

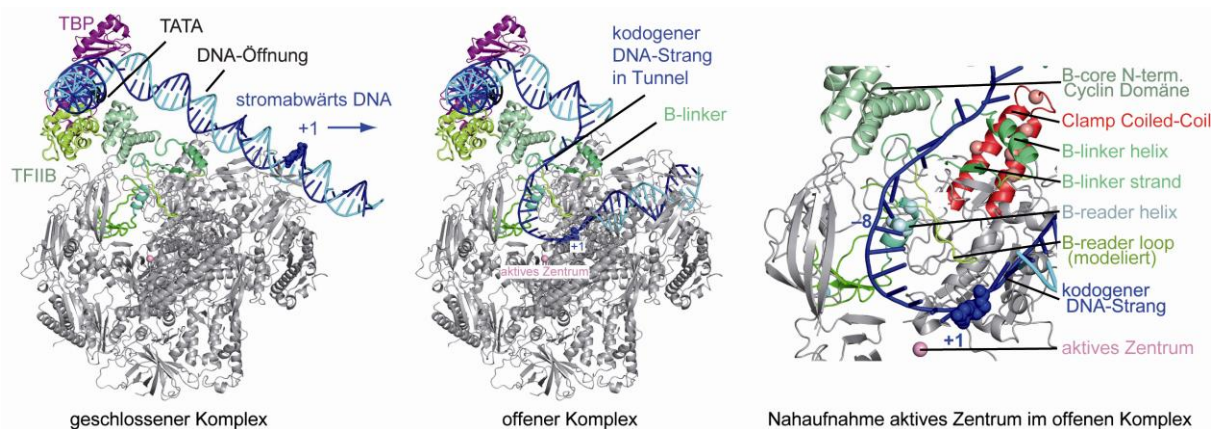


Abb. 16. Modelle für den geschlossenen und offenen minimalen Initiationskomplex von *S. cerevisiae*. Die Komplexe bestehen aus RNAP (silber), TFIIB (grün), TBP (violett) und DNA (blau). In der Nahaufnahme sind einzelnen Element von TFIIB in der DNA-bindenden Spalte zu erkennen, die *Clamp Coiled-Coil* Struktur ist rot dargestellt. Um den Blick auf die DNA-bindende Spalte freizugeben, ist Rpb2 nicht gezeigt. Die Abbildung wurde modifiziert aus (Kostrewa et al., 2009) übernommen. Details siehe Text.

Komplex parallel zur *Cleft*, und der *B-core* sitzt über *Wall*. Die C-terminale *Cyclin* Domäne ist gegenüber dem Hahn Modell um ca. 60° gedreht, weshalb sich ein anderer Verlauf der stromaufwärts der TATA-box gelegene DNA ergibt (vgl. Einleitung, Abb. 4).

Ausgehend von den verbesserten Strukturdaten wird ein zweites Set an TFB-Mutanten entworfen. Eine Übersicht über die im Folgenden untersuchten Mutationen in TF(II)B von *P. furiosus* und *S. cerevisiae* ist in Abb. 17 gegeben.

Um einzugrenzen, welcher Abschnitt des *B-readers* für die in Kap IV.3 beschriebene Funktion im Stabilisieren des stromabwärts Endes der Transkriptionsblase verantwortlich ist, werden folgende Mutationen untersucht: zwei konservierte Arginine an Position 45 (*S.c.* TFIIB R64) und 57 (*S.c.* TFIIB R78), die sich jeweils in *B-reader helix* bzw. *B-reader loop* befinden, werden zu Alanin und Glutamat mutiert. Ein weiterer nicht konservierten Rest in der *B-reader helix* (A49) wird zu einem Asparagin mutiert. Zusätzlich werden 5 Aminosäuren der Mitte und damit in der vorhergesagten Spitze des *B-reader loops* deletiert, welche R57 einschließen.

Um die nun klar definierten Abschnitte des *B-linkers* näher zu charakterisieren werden sie ebenfalls gezielt verändert. Der *B-linker turn* wird deletiert beziehungsweise hydrophobe Reste durch Alanine ersetzt. Ebenso wird der *B-linker strand* deletiert sowie eine Alanin-Substitutionsmutante erstellt, wobei die geladene nicht konservierte Aminosäure (R bzw. E in *S. cerevisiae* und *P. furiosus*) nicht ersetzt wird. Zusätzlich wird zur Kontrolle des L92P Ergebnisses die gesamte *B-linker helix* deletiert.

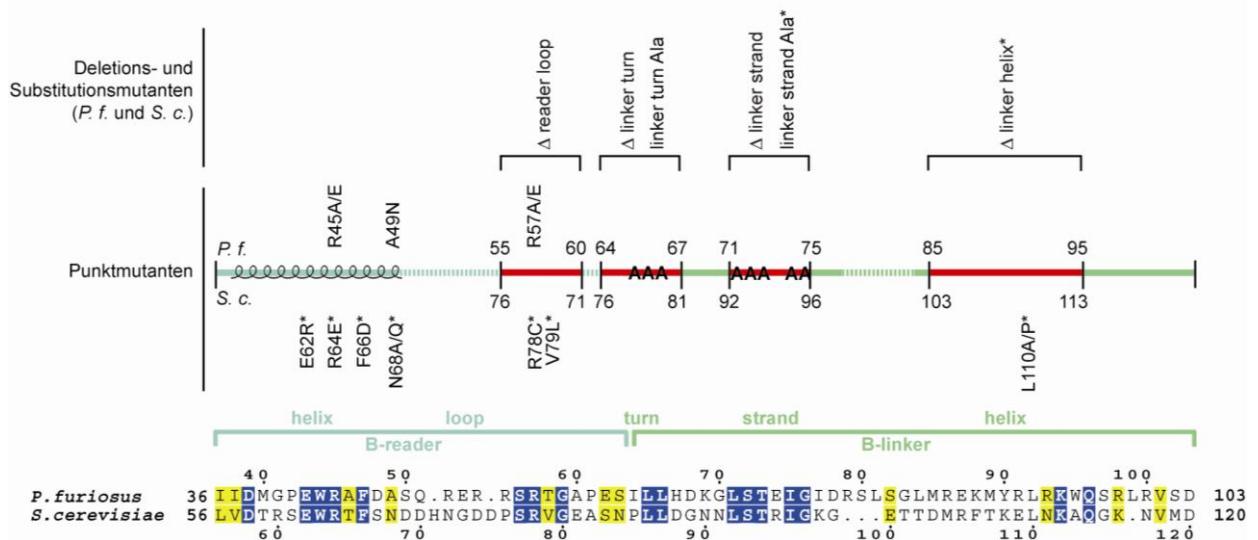


Abb. 17. Übersicht TF(II)B Mutanten der zweiten Analyserunde. Mit * versehene Mutationen kennzeichnen Hefe TFIIB-Varianten, die zusätzlich *in vivo* untersucht wurden. *S. c.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. f.*, *Pyrococcus furiosus*.

5. Zweiter TFB Mutanten-Satz

Aufreinigung und Promotorbindung

Wie bereits in der ersten Analyserunde werden alle TFB Mutanten in zwei chromatographischen Schritten aufgereinigt, wobei alle Varianten vergleichbare Elutionsprofile aufweisen (nicht gezeigt). Eine Analyse der aufgereinigten Proteine auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel ist in Abb. 18a gezeigt. Darüber hinaus wird mittels *Band Shift* die Bildung stabiler Initiationskomplexe verifiziert (Abb. 18b, Spuren 4-17). Wie bereits in der ersten Mutageneserunde, beeinflussen auch die TFB Mutationen der zweiten Runde in *B-reader* und *B-linker* die RNAP-Bindung an den Promotor nicht.

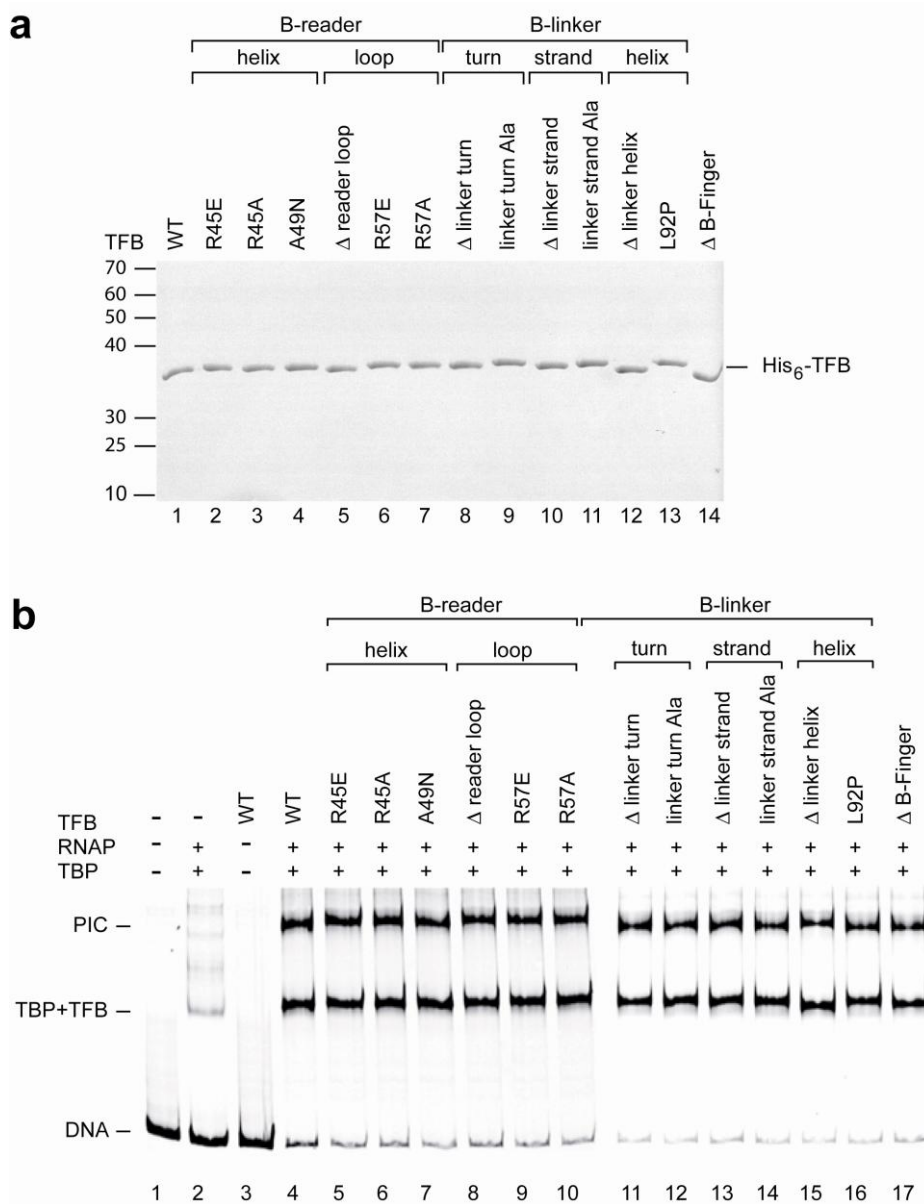


Abb. 18. *P. furiosus* TFB Mutanten der zweiten Analyserunde. (a) Analyse der mutanten TFBs auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel. Rechts des Gels sind die Laufweiten des Proteinstandards markiert. **(b) Band-Shift** Analyse mit Cy5-endmarkierter *gdhC20*-Promotor-DNA. Initiationskomplexe (PICs) entsprechen einem Komplex aus DNA, TBP, TFB und RNAP.

Die Transkriptionsaktivität von *B-reader* Mutanten ist durch TFE stimulierbar.

Um die Transkriptionsaktivität mit den Varianten von *P. furiosus* TFB sowie deren Stimulierbarkeit durch TFE zu testen, werden Run-Off Transkriptionsversuche in An- und Abwesenheit von TFE durchgeführt (Abb. 19). Die Mutationen an den konservierten Argininen R45 und R57 bewirken gegenüber dem Wildtyp verminderte Run-Off Transkription, wobei sich die Mutation zu Glutamat stärker auswirkt als die zu Alanin (Abb. 19, Spur 3 und 5, 11 und 13) und die Mutation im *B-reader loop* (R57) einen stärkeren Effekt hat als die in der *B-reader helix* (R45). Der durch die R57E Substitution verursachte Defekt entspricht quantitativ etwa dem der Deletion des *B-reader loops*. Der nicht konservierte Rest A49 in der *B-reader helix* hingegen weist keinen Transkriptionsdefekt auf. Deletions- und Substitutionsmutanten im *B-linker strand* sowie in der *B-linker helix* zerstören die Transkriptionsaktivität ebenso wie die Helix-brechende Mutante L92P.

In Hinblick auf die TFE-Reaktivität kristallisiert sich deutlich heraus, dass die Transkriptionsaktivität bei Mutation der *B-reader* Region durch TFE gesteigert wird, während die *B-linker* Mutationen auch in Gegenwart von TFE Run-Off Transkription verhindern (Abb. 19). Die Transkriptionsaktivität mit der *B-linker turn* Mutante ist ebenfalls durch TFE stimulierbar, wobei dies weniger auf die Alanin-Substitutionsmutante zutrifft als auf die Deletionsmutante (Abb. 19, Spur 16 und 18).

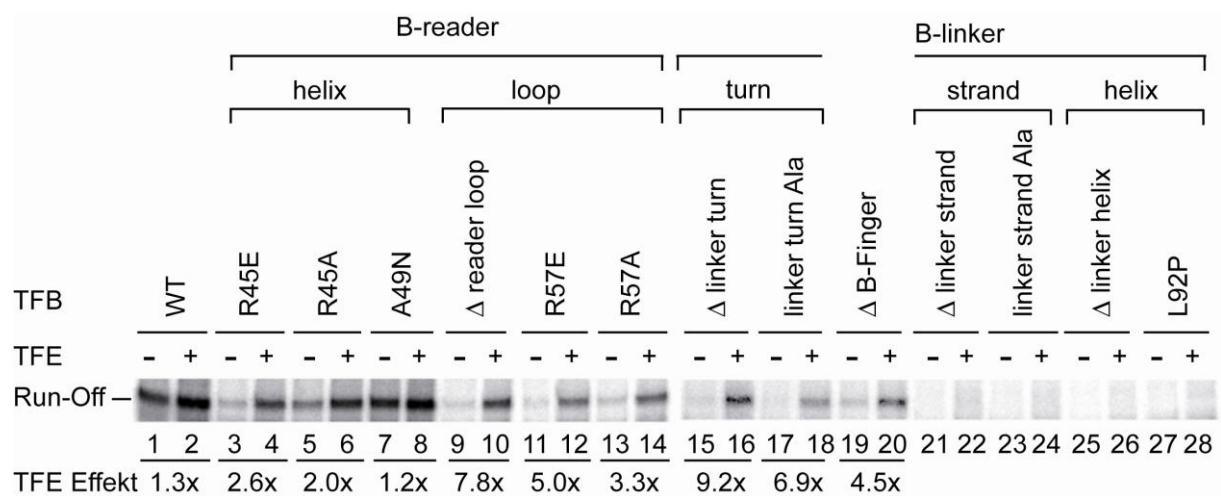


Abb. 19. Run-Off Transkriptionsaktivität mit mutanten *P. furiosus* TFBs. Run-Off Transkripte des *gdhC20*-Promotors in Gegenwart von Wildtyp (WT) oder mutanten TFBs sind auf einem denaturierenden 8% Polyacrylamid Gel aufgelöst. Die angegebene Aktivitätssteigerung (TFE Effekt) wurde durch Bildung des Quotienten der Run-Off-Signale mit und ohne TFE ermittelt.

Detailanalyse zur Promotor-Öffnung

Um zu überprüfen, ob die Verminderung der Run-Off Aktivität mit den TFB Mutanten auf einen Defekte im Aufschmelzen der Promotor-DNA zurückzuführen ist, wird eine KMnO₄-Footprintanalyse durchgeführt (Abb. 20). Widerspruchsfrei zur Run-Off Transkriptionsaktivität hatte die TFB-Mutante A49N keinen Effekt auf die Promotoröffnung (Abb. 20, Spur 10 und 11). Alle anderen Mutationen im *B-reader* hatten hingegen einen

deutlich schwächenden Einfluss auf das Footprint Signal, welches bei diesen Mutanten durch TFE verstärkt wird. Im Fall von R45 in der *B-reader helix* bewirkt die Glutamat-Substitution gegenüber dem Wildtyp eine Schwächung des +2/+3 Signals, während bei Alanin-Substitution auch diese Positionen normal geöffnet wird (Abb. 20, Spur 7 und 9). Deletion der Spitze des *B-reader loops*, sowie eindrucklicher Weise Mutationen im darin enthaltenen R57 führen zum Verlust des Footprint-Signals am stromabwärtsende der Transkriptionsblase, und zwar sowohl im Falle einer Substitution durch Glutamat als auch durch Alanin. Der Phänotyp dieser Punktmutanten entspricht damit dem der ΔB -Finger Ausgangsmutante, in welcher 20 Aminosäuren deletiert wurden (Abb. 20, Spuren 3-4, 14-17). Daher ist R57 eine entscheidende Aminosäure für die Stabilisierung der Transkriptionsblase am stromabwärts Ende.

Die *B-linker strand* und *B-linker helix* Mutanten können - wie ursprünglich bei der L92P Mutante (Kap. IV.3) beobachtet - auch in Gegenwart von TFE die Promotor DNA nicht aufschmelzen (Abb. 20, Spuren 22-29). Dies belegt, dass nicht nur die *B-linker helix*, sondern auch der *B-linker strand* von entscheidender Bedeutung für den Öffnungsprozess ist.

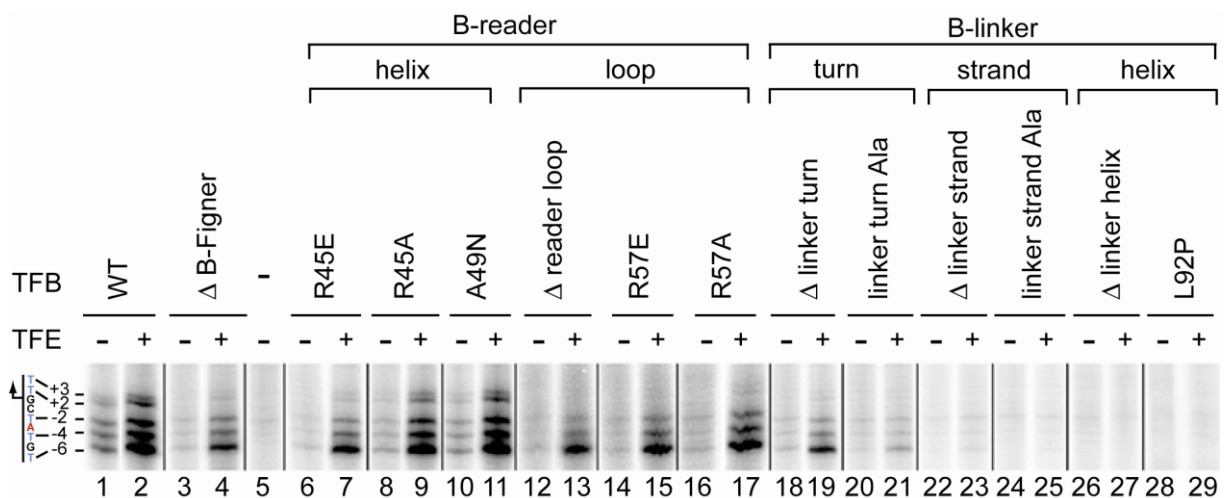


Abb. 20. Promotor-Öffnung mit mutanten *P. furiosus* TFBs. Gezeigt ist ein KMnO_4 -Footprint am nicht-kodogenen DNA-Strang des *gdhC20*-Promotors, mit (+) oder ohne (-) TFE, in Gegenwart von wildtypischen (WT) oder mutanten TFBs. Die Sequenz des nicht-kodierenden DNA-Stranges ist links abgebildet, die Nummerierung der Thymidinpositionen erfolgt relativ zum Transkriptionsstart +1.

Die *B-linker turn* Mutanten (Abb. 20, Spur 18-21) nehmen sowohl strukturell als auch funktionell eine Mittelstellung zwischen *B-linker* und *B-reader* ein. Auffallend ist, dass im KMnO_4 -Footprint so wie im Run-Off Test die Reaktivität der Alanin-Substitutionsmutante gegenüber TFE verringert ist. Ebenfalls beeinträchtigt ist die Startstellen-Öffnung. Wir gehen davon aus, dass diese Mutationen sowohl die Funktion des *B-linkers* als auch die des *B-reader loops* beeinträchtigen.

6. Transkription an vorgeöffneten Transkriptionsblasen

Synthetische Matrizen

Um zu beweisen, dass mit *B-linker* Mutanten von TFB topologisch korrekte, jedoch gewissermaßen „verschlossene“ Initiationskomplexe gebildet werden, wird mittels vorgeöffneten Transkriptionsblasen der Schritt des Promotor-Öffnens umgangen um so die RNAP-Aktivität wieder herzustellen.

Zunächst werden dafür synthetische Matrizen, Derivate der *Bubble1* (Naji et al., 2008), verwendet. In bisherigen Versuchen mit der *Bubble1* ergaben sich stets nicht eindeutig zu erklärende Effekte, was uns zum Entwurf neuer Matrizen bewegte. In Abb. 21a ist eine Übersicht über die weiterentwickelten Templates gegeben.

Eine *Bubble1*-Eigenschaft ist, dass die Startstelle gegenüber der geschlossenen Matrize um eine Position verschoben ist. Es wurde vermutet, dass die RNAP mit dem Template-, nicht mit dem Non-Template-DNA-Strang sequenzspezifisch interagiert. Daher sind die Basenfehlpaarungen der neuen Konstrukte so entworfen, dass die Template-Sequenz in den Gegenstrang kopiert ist und nicht umgekehrt (Abb. 21a). Tatsächlich wird dadurch die Verwendung des normalen Startpunktes wiederhergestellt (Abb. 21b, vgl. z.B. Spur 1, Spur 9 und Spur 13).

Darüber hinaus kommt es an der *Bubble1* stets zu RNA-Synthese Abbrüchen nach 11-13 Nukleotiden. Frühere Variationen der *Bubble1* geben Hinweise darauf, dass mit der Länge der Matrize die Transkriptionsstopps relativ zum Run-Off abnehmen (nicht gezeigt). Aus diesem Grund werden die neuen Konstrukte stromaufwärts um 10, stromabwärts um 20 Basenpaare verlängert. Außerdem wird eine kleinere Blase an Positionen -11|-10|-9 relativ zum Startpunkt getestet. Abb. 21b zeigt, dass die Transkriptionsstopps sowohl durch Verlängerung des Templates (Abb. 21b, z.B. Spur 9 und 13), als auch durch Verkleinern der Blase (Abb. 21b, z.B. Spur 5 und 9) abnehmen.

Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass die RNAP auf der kurzen *Bubble1* in der Lage ist, Faktoren-unabhängig zu transkribieren. Wir gehen davon aus, dass dieser Effekt insbesondere bei 70°C durch leicht aufschmelzende Template-Enden verursacht wird, welche wiederum von der RNAP gebunden werden. In Abb. 21b, Spur 17 ist gezeigt, dass durch Verlängerung des Templates Faktoren-unabhängig nur noch ein langes Produkt gebildet wird. Da dessen Herkunft nicht eindeutig zu klären ist, werden zur Quantifizierung der TFB-Aktivität die Transkriptionsstopps herangezogen.

Die synthetischen Transkriptionsblasen werden wie in Abb. 21b mit allen TFB-Mutanten der zweiten Runde, sowie den ΔB -Finger und L92P Mutanten getestet, exemplarisch ist nur das Ergebnis der *B-linker strand* und ΔB -Finger Mutanten gezeigt.

Alle Mutanten zeigen gegenüber dem Run-Off Test auf der synthetischen Matrize eine geringfügig erhöhte Aktivität. Die *B-reader helix* Mutanten R45E und R45A erlauben bereits durch die kleine stromaufwärts gelegene Blase in *Bubble L1* Wildtyp-Aktivität. Die Transkription mit den beiden R57 Mutanten erreicht hingegen erst an der vollständigen Transkriptionsblase in *Bubble L2* Wildtypniveau. Dies steht im Einklang mit den KMnO₄-

Außerdem wird durch die Verwendung des Heteroduplex Templates erstmals Aktivität mit den *B-linker* Mutanten nachweisbar. *Bubble L2* ermöglicht annähernd 50% der Wildtypaktivität. Dies belegt, dass die *B-linker* Mutanten einen Defekt im Promotor Öffnen aufweisen und die RNAP in den mit diesen Mutanten gebildeten Initiationskomplexen grundsätzlich transkriptionskompetent ist.

Alle TFB Mutanten bilden gegenüber dem Wildtyp weniger abortive Transkripte (RNAs die kleiner sind als 11 nt). Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass abortive Transkription durch Kollision der wachsenden RNA mit dem in der RNAP *Cleft* inserierten Elementen von TFB verursacht wird.

Lange vorgeöffnete Matrizen

Die Transkriptionsversuche auf den synthetischen Matrizen lässt immer noch die Frage nach dem Entstehungsgrund für die Transkriptionsstopps ungeklärt. Da dieser Effekt bei Transkription bis Position 15 oder 20 auf 300 bp langen, PCR-generierten Matrizen nicht auftritt, wird angenommen dass die Länge des DNA-Templates für den Ablauf der korrekten Initiation von entscheidender Bedeutung ist. Um dies zu überprüfen, werden mittels einer von (Thomas et al., 2002) adaptierten Methode vorgeöffnete Versionen der *gdhC20*-Ausgangsmatrize hergestellt, Basenfehlpaarungen an Position -11|-10|-9 (*open upstream*, O^U) sowie bei -2|-1|+1 (*open start*, O^S) eingeführt (Abb. 22).

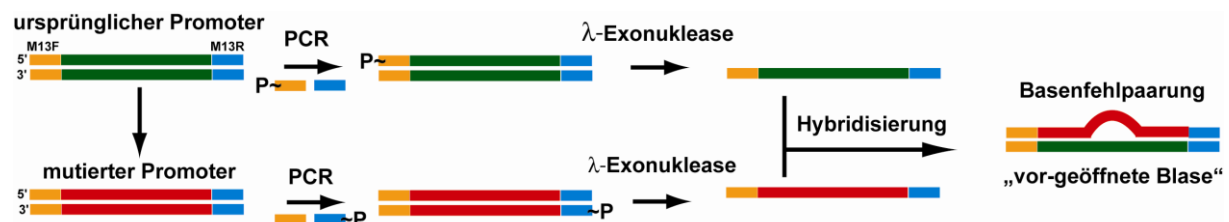


Abb. 22. Herstellung langer Matrizen mit einer vorgeöffneten Transkriptionsblase. In den ursprünglichen Promotor wird zunächst die Sequenz welche später die Basenfehlpaarung ergeben soll über Fusions-PCR eingeführt. Mutierte und ursprüngliche Sequenzen werden mittels PCR amplifiziert, wobei jeweils gegengleich nur einer von beiden Primern am 5'-Ende phosphoryliert vorliegt. Dies ermöglicht im Anschluss den spezifischen Abbau des 5'-phosphorylierten DNA-Stranges durch die λ-Exonuklease. Die resultierenden Einzelstränge werden hybridisiert, aus dem Gel gereinigt und können so als Transkriptionsmatrize eingesetzt werden. Die „geschlossenen“ Kontrollmatrizen werden nach gleichem Protokoll aus ausschließlich der ursprünglichen Sequenz hergestellt.

In einer Kinetik wird zunächst überprüft, nach welcher Zeitspanne keine Zunahme des 20 nt Transkripts am *gdhC20*-Promotor mehr zu verzeichnen ist. Dies ist im Zeitrahmen zwischen 5 und 15 min der Fall (nicht gezeigt), weshalb alle Reaktionen mit mutanten TFBs 15 min lang inkubiert werden. Faktoren-unabhängig wird unter den gewählten Bedingungen auf der geschlossenen und der O^U Matrize kein Transkript gebildet. Auf der O^S Matrize entsteht ein 14 nt langes Transkript. Run-Off Transkription ergibt ein Produkt selber Länge auf allen Matrizen (nicht gezeigt).

nur die Hintergrundaktivität mit dieser Mutante zu stimulieren. Die *B-linker strand Ala* und Δ *linker helix* Mutanten erlauben Transkription nur an der O^S Matrize, die Δ *linker strand* Mutante hingegen zeigt keine Aktivität.

Um das Ergebnis in seiner Aussage zu vereinfachen, wird mit ausgewählten TFB Mutanten ein abortiver Test an den unterschiedlichen vorgeöffneten Matrizen durchgeführt (Abb. 24). Ein großer Vorteil dieses Testes ist abgesehen von der hohen Sensitivität, dass hier Faktoren-unabhängig keine Aktivität detektierbar ist (nicht gezeigt). Die beiden *B-linker* Mutanten besitzen keine Hintergrund-Aktivität auf der geschlossenen Matrize, ermöglichen aber bei Voröffnen der Transkriptionsblase insbesondere im Startbereich die Synthese des Trinukleotids.

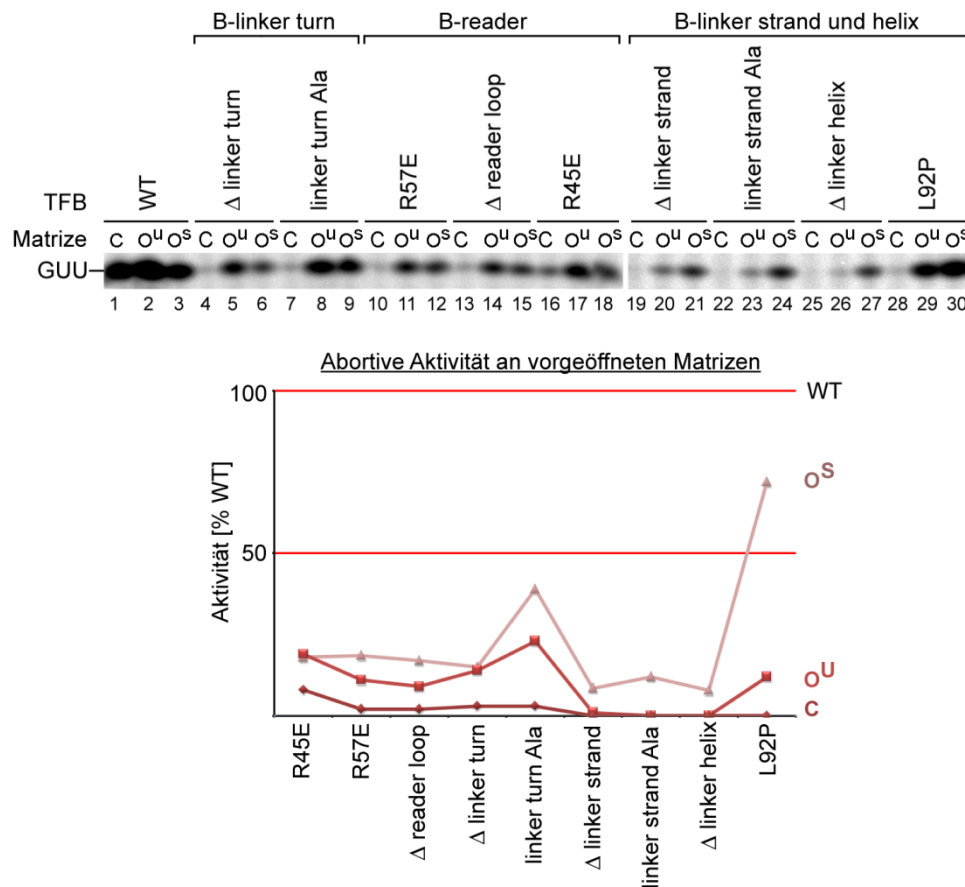


Abb. 24. Abortive Transkription an langen Matrizen mit einer vorgeöffneten Transkriptionsblase. (a) In Gegenwart des Dinukleotides GU und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ wird an den getesteten *gdhC20*-Derivaten (s. Abb. 23d) ein Trinukleotid GUU gebildet. (b) Die Syntheseaktivität mit mutanten *P. furiosus* TFBs ist relativ zu der mit wildtypischem TFB (WT) quantifiziert.

7. Mutationsanalyse der Clamp Coiled-Coil

In der neuen Struktur von Pol II mit TFIIB verläuft die *B-linker helix* parallel zur DNA-bindenden Spalte oberhalb von *Rudder* und senkrecht zu einer *Coiled-Coil* Struktur in der *Clamp* (a8 und a9 in Untereinheit Rpb1/A', s. auch Abb. 15, 16 und 44). Um eine mögliche Interaktion zwischen dem *Coiled-Coil* und TFB zu untersuchen, werden in der *P. furiosus* RNAP Aminosäuren des *Coiled-Coils* verändert, deren Seitenketten in Richtung der zu Beginn noch putativen TFB *Linker-Helix* ragen (Abb. 25b). N-terminal des *Coiled-Coils* befindet sich die Schleife *Lid*, C-terminal *Rudder*. Beide sind in verschiedenen Phasen des Transkriptionszyklus involviert (Naji et al., 2008). Es handelt sich um einen hochkonservierten Bereich in allen drei Domänen des Lebens (Abb. 25a).

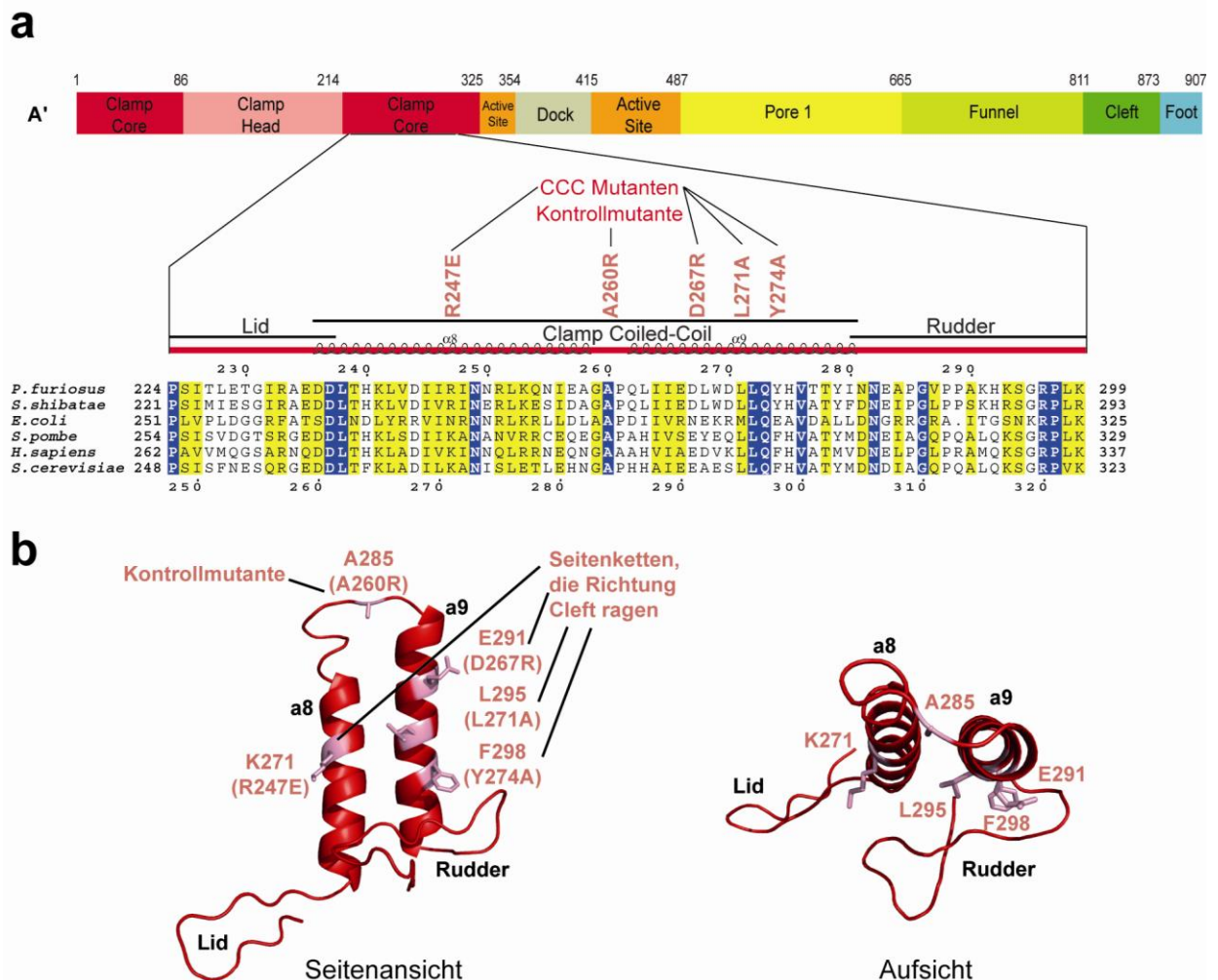


Abb. 25. Mutagenese im Clamp Coiled-Coil der Untereinheit A'. (a) Schematische Darstellung der Primärsequenz von *P. furiosus* A'. Die Bezeichnung und Färbung der Domänen erfolgt nach (Cramer et al., 2001). Darunter ist ein Sequenzalignment des Coiled-Coils sowie der angrenzenden Cleft Loops *Lid* und *Rudder* in A' (*P. furiosus* und *S. shibatae*), β' (*E. coli*) bzw. Rpb1 (*H. sapiens*, *S. cerevisiae*) dargestellt (erstellt mit MUSCLE (Edgar, 2004), Darstellung mit ESPript (Gouet et al., 1999). Konservierte Positionen sind dunkelblau, ähnliche Positionen gelb unterlegt. (b) Struktur des Coiled-Coils von *S. cerevisiae* in Seitenansicht und Aufsicht (PDB 1I50, (Cramer et al., 2001)). In rosa sind die Richtung DNA-bindende Spalte ragenden Seitenketten, in Klammer die Mutationen in *P. furiosus* A' dargestellt.

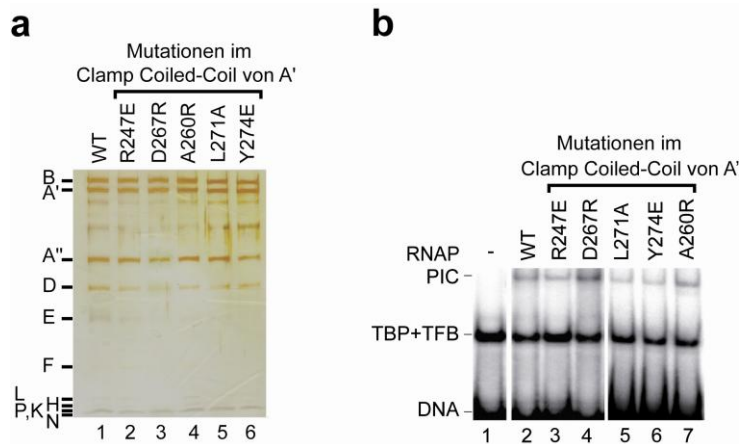


Abb. 26. Rekonstitution mutanter RNAPs.

(a) Silber-gefärbtes 4-20% SDS-Polyacrylamid-Gradientengel zur Darstellung der rekonstituierten RNAPs. (b) Band Shift Test mit am 5'-Ende radioaktiv markierter *gdhC20*-Promotor-DNA. PIC bezeichnet den Komplex aus TBP, TFB und RNAP.

Rekonstituierte RNAPs werden in Polyacrylamidgelen mittels Silberfärbung sichtbar gemacht und quantifiziert (Abb. 26a). Im *Band Shift Assay* zeigt sich, dass alle RNAPs in der Lage sind einen ternären Komplex zu bilden (Abb. 26b). Quantitative Aussagen über die Initiationskomplexstabilität können aufgrund der starken Schwankungsbreite der Signalstärken mit rekonstituierten RNAPs nicht getroffen werden.

Transkriptionsaktivität mutanter RNAPs

Bis auf Kontrollmutante A260R an der Spitze des *Coiled-Coils*, besitzen alle mutanten RNAPs keine Run-Off Aktivität. Die Zugabe von TFE kann die Run-Off Aktivität nicht wiederherstellen (nicht gezeigt). Im abortiven Test besitzen die Mutanten des *Coiled-Coils* gegenüber dem WT stark verringerte Aktivität (Abb. 27a und b).



Abb. 27. Transkriptionsaktivität mutanter RNAPs. (a) Abortiver Test. Die *Clamp Coiled-Coil* Mutanten besitzen eine stark verminderte Trinukleotidsyntheseaktivität (GUU). Die Signale von WT und A260R sind stark überexponiert, um die Aktivität der mutanten RNAPs sichtbar zu machen. (b) Run-Off Test.

Da mutante, rekonstituierte RNAPs, wenn überhaupt nur sehr schwache KMnO_4 -Footprint-Signale geben, werden alternativ dazu *gdhC20*-Matrizen mit 3 Basenfehlpaarungen im Bereich der Transkriptionsblase verwendet, welche erlauben Promotor-Öffnungsdefekte zu kompensieren (s. Kap. IV.6). Tatsächlich wird die Transkriptionsaktivität mit diesen Matrizen zumindest teilweise wiederhergestellt (Abb. 28). Das Ergebnis bei Transkription bis Position 20 unterscheidet sich nicht von dem des Run-Offs. Außerdem ist kein Unterschied einer stromaufwärts oder stromabwärts vorgeöffneten Matrize zu sehen (nicht gezeigt). Das Entstehen eines Run-Offs bzw. einer 20 nt langen RNA lässt weiter darauf

schließen, dass kein signifikanter *Promoter Escape*-, Startstellenselektions- oder Elongationsdefekt bei den untersuchten *Coiled-Coil* Mutationen vorliegt.

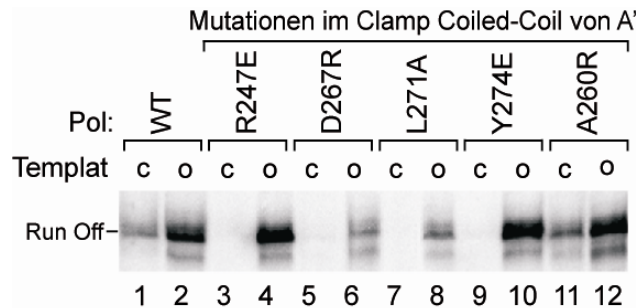


Abb. 28. Wiederherstellung der Aktivität der *Coiled-Coil* RNAP Mutanten an vorgeöffneten Matrizen. C, geschlossene (*gdhC20*)-Matrizen. O, vorgeöffneten Matrizen (vgl. Abb. 23d).

Um eine direkte Interaktion zwischen dem *Coiled-Coil* der RNAP und der *B-linker helix* von TFB nachzuweisen, wird versucht die Aktivität von Ladungsumkehrmutanten in der RNAP (D267R, R247E) mit Ladungsumkehrmutanten in TFB wiederherzustellen. Es werden zusätzlich zu TFB-Mutante K88E drei konservierte Arginine (R79, R85, R93) im *B-linker* zu Aspartat getauscht. Der Versuch bleibt jedoch erfolglos, was vermuten lässt, dass entweder nicht der richtige Seitenkettenrest mutiert wurde, oder die Bereiche nicht über eine Salzbrücke miteinander interagieren. In einem Zukunftsprojekt sollen die α -Helices des *Clamp Coiled-Coils* und des *B-linkers* mit denen anderer Organismen ausgetauscht werden um sich spezifisch zu ergänzen.

8. In vivo Analyse von *S. cerevisiae* TFIIB Mutanten

Auch wenn die Transkriptionsmaschinerie von Archaeen strukturell und funktionell der eukaryotischen Pol II Maschinerie stark ähnelt, ist nicht unmittelbar klar, wie die Ergebnisse des *P. furiosus* Systems aus den vorherigen Abschnitten auf das viel komplexere *S. cerevisiae* System übertragen werden können.

Um herauszufinden, welchen Einfluss die im archaeellen TFB charakterisierten Mutationen in TFIIB auf die Initiation in Hefe haben, wird zunächst deren Effekt auf die Wachstumsrate von *S. cerevisiae* untersucht. Die Lebensfähigkeit der TFIIB mutanten Hefestämme (Überblick s. Abb. 17) wird durch Spotten einer Verdünnungsreihe auf FOA-Platten überprüft. Die beiden *B-linker strand* Mutanten sind letal (Abb. 29). Um die Effekte der TFIIB-Mutationen auf die Lebensfähigkeit der Hefe quantitativ zu erfassen, werden die Stämme in Vollmedium gezogen und Wachstumskurven bei 30°C aufgezeichnet. Das Ergebnis ist in Abb. 30 graphisch dargestellt. Mutationen in der *B-reader helix* haben von E62R, R64E, F66D bis A68N einen abnehmenden Effekt. Während E62R eine Verdoppelungszeit von 165 min aufweist, wachsen die N68A/Q Mutanten wie der Wildtyp

mit einer Generationsdauer von 100 min. Die Punktmutation an Position R78 (*P. furiosus* R57) zu Cystein ist schwerwiegender als die Mutation des benachbarten V79 zu Leucin (143 vs. 118 min). Die Mutation R78E ist für Hefe letal (Pinto et al., 1994). Die Deletion der putativen *B-reader loop* Spitze hat unter allen getesteten Mutanten mit 181 min die höchste Verdoppelungszeit. Mutagenese im *B-linker turn* sowie die *B-linker helix* Mutanten L110P und L110A bewirkt keinen messbaren Effekt auf die Verdoppelungszeit. Die *B-linker helix* Deletion bewirkt einen schwachen Wachstumsdefekt mit einer Generationszeit von 108 min.

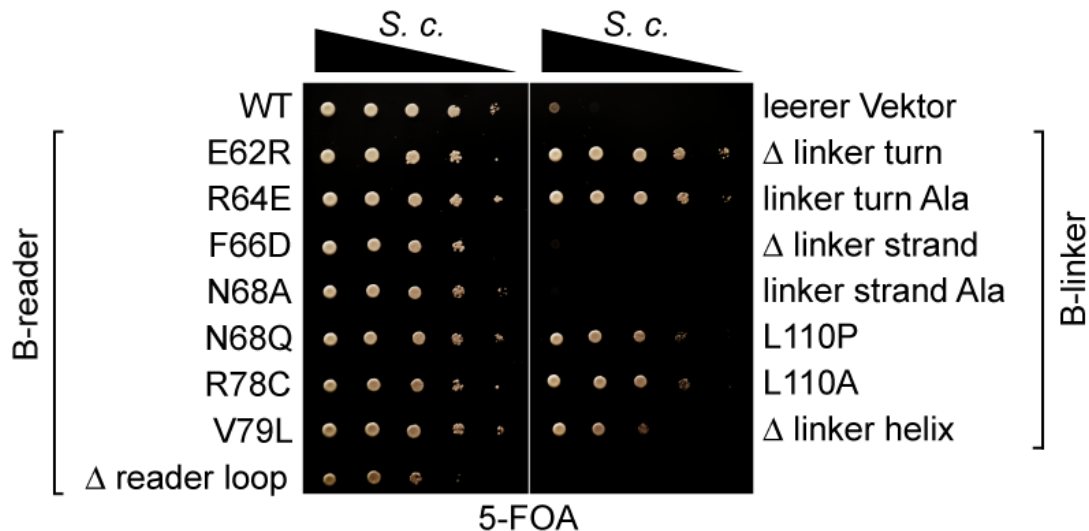


Abb. 29. Lebensfähigkeit von SUA7 (TFIIB) mutanten Hefestämmen. Hefestämme mit chromosomalem TFIIB-Knockout, einem URA3-selektierbaren Plasmid mit wildtypischem TFIIB-Gen und einem LEU2-selektierbaren Plasmid mit mutantem TFIIB-Gen werden bis zur späten exponentiellen Phase in Vollmedium gezogen, dann auf OD=1 in Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wird eine Verdünnungsreihe (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) hergestellt und davon 3 μ l auf die 5-FOA (*5-fluoroorotic acid*) getropft. 5'-FOA bewirkt den Verlust des Plasmides mit wildtypischem TFIIB-Gen aufgrund des URA3-Markers.

Da funktionell wichtige TFIIB Punktmutationen typischer Weise einen kältesensitiven oder seltener auch temperatursensitiven Phänotyp bewirken (Pinto et al., 1994; Bangur et al., 1997; Pardee et al., 1998; Cho und Buratowski, 1999; Faitar et al., 2001; Zhang et al., 2002), wird das Wachstum der Hefestämme auf YPD-Platten bei verschiedenen Inkubationstemperaturen verglichen. Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Tab. 2. Die Temperatursensitivität von Mutanten E62R, R64E, F66D, V79L und R78C ist bereits aus der Literatur bekannt. Passend dazu ist auch die Deletion des *B-readers loops* kältesensitiv, zusätzlich auch hitzesensitiv. Keine der *B-linker* Mutanten weist einen temperaturabhängigen Wachstumsdefekt auf.

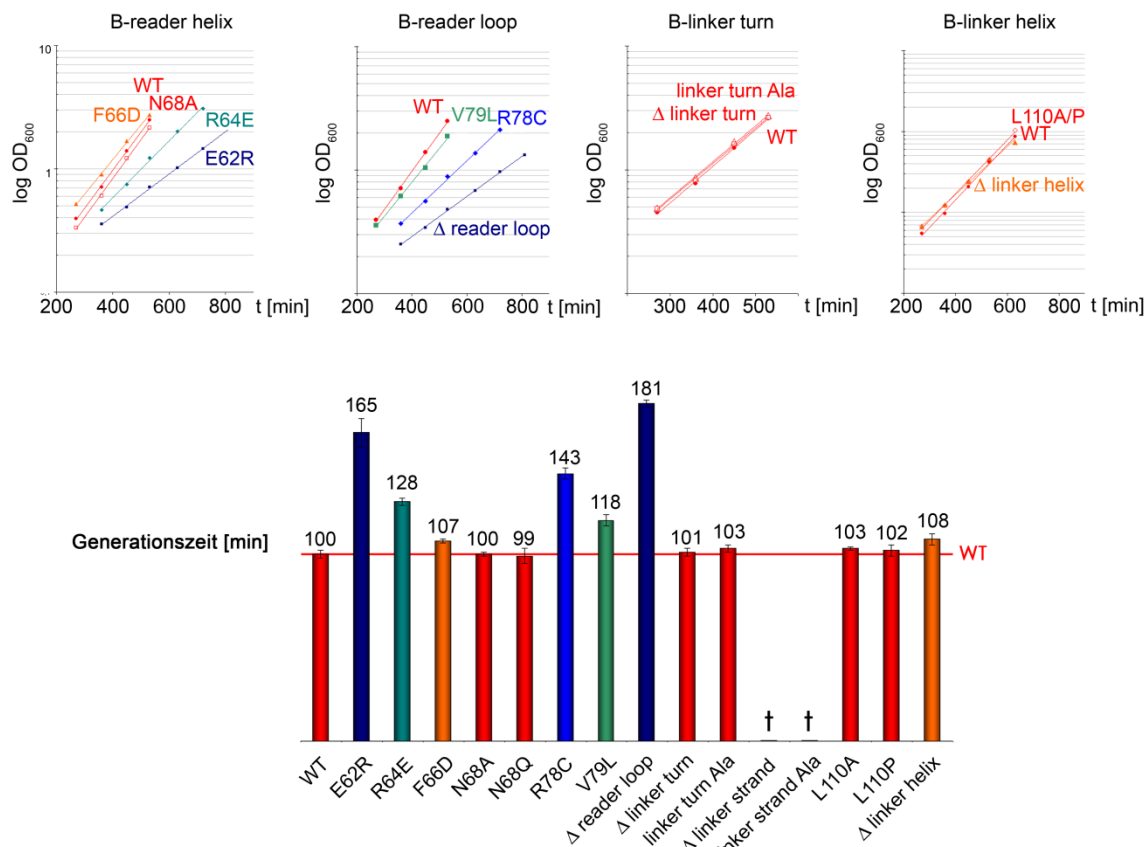


Abb. 30. Wachstumskurven und Generationszeiten von TFIIB-mutanten Hefestämmen. Die Generationsdauer τ der TFIIB-mutanten Hefestämme wurde in YPD Vollmedium bei 30°C ermittelt. Im Balkendiagramm sind Hefemutanten mit wildtypischem Wachstum ($\tau = 100$ min) rot, mit leicht verlangsamtem (bis $\tau = 110$ min) Wachstum orange, mittelmäßig verlangsamtem Wachstum (bis $\tau = 130$ min) grün, und sehr langsamem Wachstum blau bis dunkelblau dargestellt.

TFIIB Mutation	Kältesensitivität	Hitzesensitivität
E62R	X	X
R64E	X	X
F66D	X	-
N68A	-	-
N68Q	-	-
R78C	X	X
V79L	X	-
Δ reader loop	X	X
Δ linker turn	-	-
Linker turn Ala	-	-
Δ linker helix	-	-
L110P	-	-
L110A	-	-

Tab. 2. Temperatursensitivität von TFIIB-mutanten Hefestämmen. Von einer Verdünnungsreihe (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) isolierter TFIIB-mutanter Hefestämme (S.c.) werden 3 μ l auf eine YPD-Vollmediumsplatte getropft und diese für 2 (30°C, 37°C) oder 5 Tage (16°C) bebrütet, um Kältesensitivität oder Hitzesensitivität relativ zum Wildtyp zu bewerten (X).

9. Entwicklung des Systems zur *in vitro* Analyse von *S. cerevisiae* TFIIB

Einige der untersuchten TFIIB-Mutationen zeigen sehr geringe bis keine Effekte auf die Wachstumsrate von Hefe unter optimalen Bedingungen oder Temperaturstress (Abb. 30 und Tab. 2). Insbesondere scheint sich die Mutation des *B-linkers* kaum auszuwirken, was in Bezug auf die essentielle Funktion für die Promotoröffnung bei *P. furiosus* verwunderlich ist. Um die Funktionsfähigkeit der TFIIB Mutanten *in vitro* testen zu können, werden die entsprechenden TFIIB Mutanten in *E. coli* kloniert, mittels C-terminalem His₆-Tag aufgereinigt und das aktivierte Transkriptionssystem mit nuklearen Extrakten nach (Ranish et al., 1999) für unsere Zwecke adaptiert.

Entwicklung einer geeigneten Transkriptionsmatrize

Da TFIIB in Eukaryoten und insbesondere bei *S. cerevisiae* die Startstellenselektion beeinflusst, wird die HIS4-Standardmatrize (Ranish et al., 1999) so verändert, dass das *Scanning*-Phänomen unter unseren Versuchsbedingungen getestet werden kann. Der Initiator in Hefe sowie in Archaeen besteht typischer Weise aus einem Pyrimidin-Purin Basenpaar an Position -1/+1. Zusätzlich besitzt die Hefe ein hochkonserviertes Adenin an Position -8. Ausgehend von der Arbeit von (Kuehner und Brow, 2006) haben wir den HIS4-Promotor (Ranish et al., 1999) mit dem Initiator des SNR14-Gens fusioniert (HIS4-SNR14). *In vivo* wird an diesem natürlich duplizierten SNR14 Promotor an hauptsächlich drei Startstellen initiiert (+1u, +1d und +7d, Abb. 31a).

Die Bestimmung der *in vitro* Transkriptionsstarts an den HIS4 und HIS4-SNR14 Templates mittels *Primer Extension* ergibt, dass *in vitro* an denselben Positionen initiiert wird wie *in vivo*. Bei den meisten Initiationsstellen befindet sich ein Adenin an den Positionen -8 oder -7 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Abb. 31a).

In vivo konnte die Initiationseffizienz an Position +1u des SNR14-Initiators durch Mutation des Adenins 8 Basen stromaufwärts des Transkriptionsstarts bedeutend beeinflusst werden (Kuehner und Brow, 2006). Um zu sehen, dass dieser Effekt auch *in vivo* auftritt, haben wir ebenfalls an Position -8 beziehungsweise an -8 und -7 das Adenin zu einem Cytosin mutiert (Abb. 31a und b). Bei Mutation des Adenins an Position -8 wird die Initiationseffizienz an +1u deutlich herabgesetzt, werden beide Adenine an Position -8 und -7 mutiert wird die +1u Startstelle nicht mehr genutzt (Abb. 31b, Spuren 2-4). Dies zeigt zum Einen, dass an der HIS4-SNR14 Matrize das *Scanning*-Phänomen mit nuklearen Extrakten wie *in vivo* auftritt und darüber hinaus, dass ein Adenin an Position -7 für ein Adenin an Position -8 partiell kompensieren kann.

Um zu bestätigen, dass die beobachteten Transkripte nicht durch Ablesen von den im nuklearen Extrakt vorhandenen Chromosomen entstehen, wird ein Kontroll-Template mit mutierter TATA-box getestet. Da mit diesem TATA-losten Promotor keine Transkripte gebildet werden, ist bewiesen, dass die nachgewiesenen RNA-Produkte von den zugesetzten Templates transkribiert werden (Abb. 31b, Spur 5).

Ermittlung der minimalen Distanz zwischen TATA-box und Transkriptionsstartpunkt

Der Umstand dass der Initiator als eigenständiges Element, also unabhängig vom Rest des Promotors funktioniert, wurde weiter genutzt, um herauszufinden welches im verwendeten *in vitro* System die minimale Distanz zwischen TATA-Box und Initiator darstellt. Es wurden zwei weitere Fusionspromotoren konstruiert, die insgesamt sechs SNR14 Wiederholungen enthalten, welche unterschiedlich nahe an die TATA-box reichen. In Version 1 beträgt die Distanz zwischen erster Initiationsstelle und TATA-box 41 bp, in Version 2 beträgt sie 30 bp. Es stellte sich heraus dass die Transkription *in vitro* ab 55 bzw. 58 nt stromabwärts der TATA-Box gestartet wird. Die maximal auftretende Distanz beträgt 106 bzw. 116 bp. Ein Vergleich der Bandenintensitäten legt die Vermutung nahe, dass es bei den von uns untersuchten Promotoren eine Präferenz für Startstellen mit einer Distanz von 72-97 bp zur TATA-Box vorliegt (Abb. 31a und c).

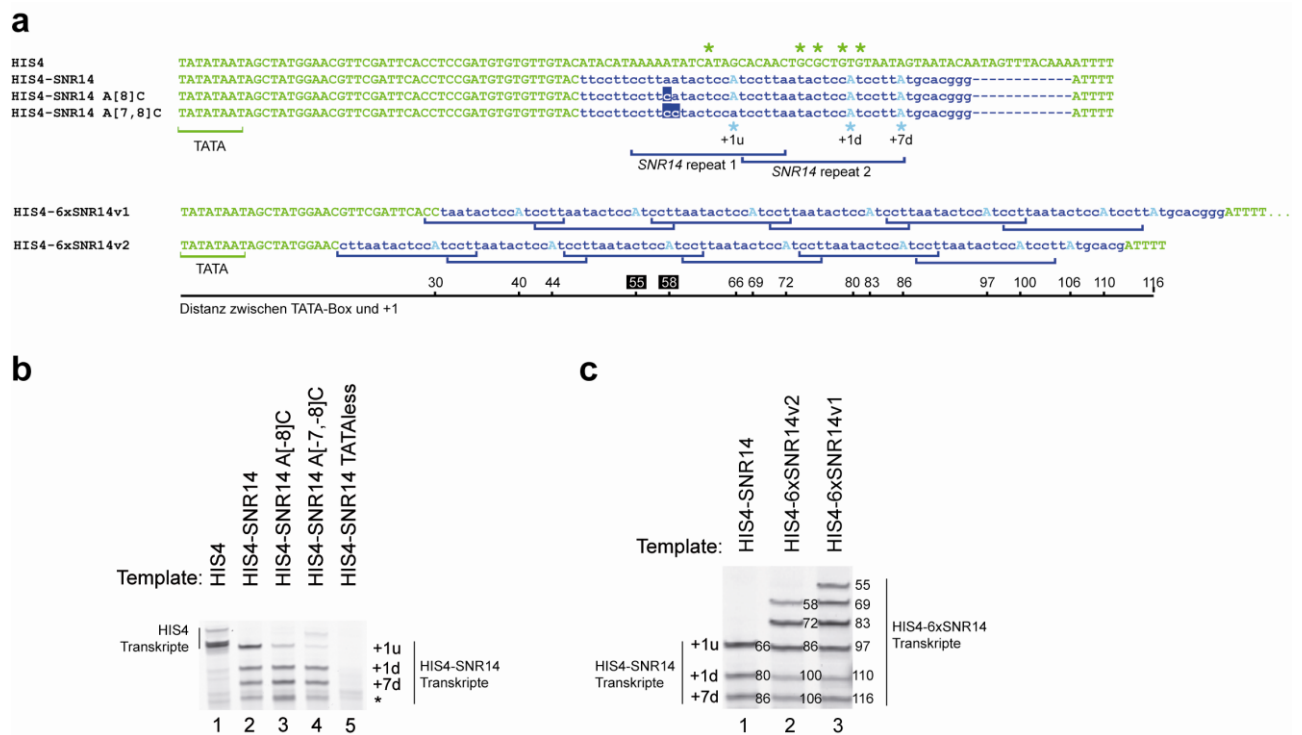


Abb. 31. Startstellennutzung im *in vitro* Transkriptionssystem von *S. cerevisiae*. (a) Schematische Darstellung der entworfenen Hefepromotoren. Die Ausgangssequenz des HIS4-Promotors (Ranish et al., 1999) ab der TATA-Box ist grün, der fusionierte Teil des SNR14-Initiators (Kuehner und Brow, 2006) ist dunkelblau dargestellt. Transkriptionsstarts sind hellblau. Die in dieser Arbeit ermittelten *in vitro* Transkriptionsstartpunkte sind durch einen Stern gekennzeichnet. (b) Einfluss des konservierten Adenins an Position -8 und -7 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. (c) Abstand zwischen TATA-box und SNR14-Initiator. Die Distanz ist in bp rechts neben den Banden vermerkt. Die Gele stammen von Martin Seizl (Labor P. Cramer).

Charakterisierung des TFIIB-abhängigen nuklearen Extraktes

Da bei Immunodepletion von TFIIB aus nuklearen Extrakten andere Komponenten der Transkriptionsmaschinerie co-depletiert werden können, ist die Verwendung des Extraktes der temperatursensitiven Hefemutante TFIIB-G41E eine elegantere Lösung um die

Funktionsfähigkeit mutanter TFIIBs *in vitro* zu testen. Mit diesem Extrakt wird ohne Zugabe von rekombinantem TFIIB am HIS4-Promotor kein Transkript gebildet und es werden keine funktionslosen Initiationskomplexe assembliert (Ranish et al., 1999). Der Extrakt verhält sich demnach so, als ob kein TFIIB vorhanden wäre.

Die Wiederherstellung der Aktivität des temperatursensitiven nuklearen Extraktes wird in einem Transkriptionsversuch durch Zugabe steigender Mengen von rekombinantem TFIIB getestet. Die Sättigung durch Zugabe von TFIIB wird bei 3.75 pmol erreicht, und anders als bei *in vitro* Transkription im archaellen System kommt es auch bei höheren Konzentrationen des Faktors nicht zu einer Inhibierung der Aktivität (Abb. 32a). An der Fusionsmatrize HIS4-SNR14 initiiert wildtypischer Extrakt präferentiell an Position +1u, wobei durch Zugabe von rekombinantem TFIIB die Transkription insgesamt stimuliert wird und die Präferenz für die Nutzung der ersten Startstelle erhalten bleibt. Der nukleare Extrakt der temperatursensitiven TFIIB Mutante funktioniert bei Zugabe von 5 pmol TFIIB in etwa so gut wie der Wildtyp (Abb. 32 b).

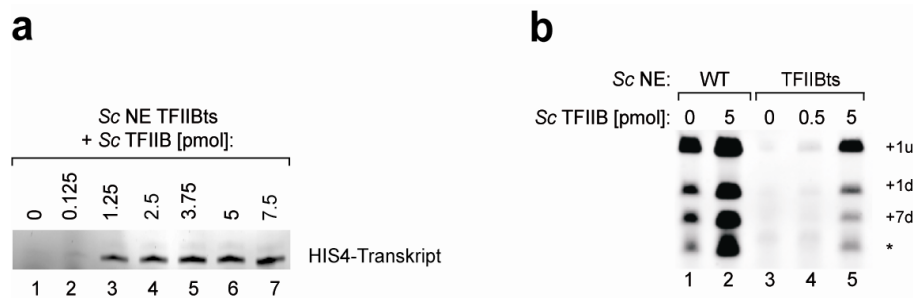


Abb. 32. Wiederherstellung der Aktivität eines temperatursensitiven nuklearen Extraktes durch Zugabe von rekombinantem TFIIB. (a) Transkription mit nuklearem Extrakt der G41E-TFIIB Mutante (Sc NE TFIIBts) am HIS4-Promotor mit steigenden Mengen an rekombinantem TFIIB. (b) Transkription am HIS4-SNR14 Promotor mit wildtypischem nuklearem Extrakt (Sc NE WT) und temperatursensitivem Extrakt in Ab- und Anwesenheit der angegebenen Mengen an rekombinantem TFIIB. Die mit Stern markierte Bande kennzeichnet eine unspezifische Bande. +1u, +1d und +7d sind Transkriptionsstarts des SNR14-Initiators (vgl. Abb. 31a).

Darüber hinaus wird eine Quantifizierung von endogenem TFIIB im wildtypischen Extrakt mittels Westernblot vorgenommen (nicht gezeigt). Die im Extrakt vorliegende Menge an rekombinantem TFIIB entspricht der Menge an rekombinantem TFIIB, die zur Sättigung der von TFIIB induzierten Aktivierung des G41E-Extraktes benötigt wird. Dies bestätigt, dass rekombinantes TFIIB trotz His₆-Tag funktionsfähig ist und das Vorhandensein der TFIIB Mutante G41E im nuklearen Extrakt die Ergebnisse nicht beeinflusst.

10. *In vitro* Analyse von *S. cerevisiae* TFIIB Mutanten

Entsprechend der *in vivo* Ergebnisse haben wir uns entschieden die vier *B-reader helix*, drei *B-reader loop*, die *linker strand Ala*, die Δ *linker helix* und die L110P TFIIB Mutanten in Hefe zu untersuchen (Abb. 17).

TFIIB wird mit C-terminalem His₆-Tag in drei Schritten über NiNTA-beads, Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration aufgereinigt. Die größte Schwierigkeit besteht im Abtrennen eines C-terminalen Fragments, welches dem proteaseresistenten *B-core* (N-terminale Sequenzierung, pers. Kommunikation A. Jawhari) entspricht. Abb. 33 zeigt ein Coomassie-gefärbtes Gel der gereinigten rekombinanten TFIIB Mutanten. Mutation einer putativen internen Ribosomenbindestelle führte nicht zum erfolgreichen Eliminieren des Fragmentes (pers. Kommunikation A. Jawhari). Mutante E62R enthielt auch zum Schluss noch einen kleinen Rest des ca. 20 kDa großen Polypeptids. Die *B-linker helix* Deletionsmutante enthielt bereits beim ersten Aufreinigungsschritt kein C-terminales Fragment. Da es bei allen anderen Mutanten bereits im bakteriellen Rohextrakt zu sehen ist (nicht gezeigt), entsteht es daher wahrscheinlich schon in *E. coli* durch proteolytischen Abbau im Bereich der *B-linker helix*.

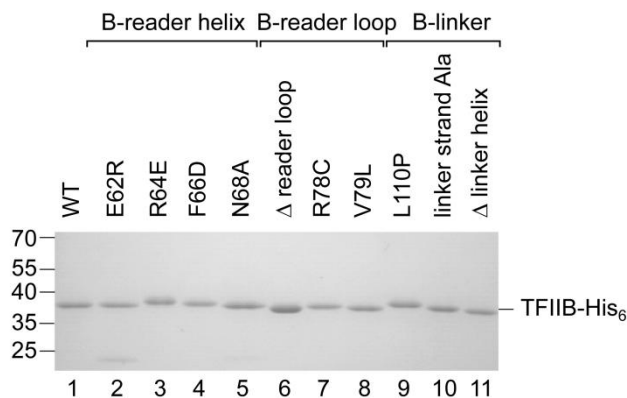


Abb. 33. Rekombinantes TFIIB von *S. cerevisiae*. Darstellung der aufgereinigten wildtypischen (WT) und mutanten Formen des *S. cerevisiae* TFIIB mit C-terminalem His₆-Tag auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel durch Coomassie-Färbung.

Analyse der *B-reader* Mutanten

In Archaeen gibt es bislang keine Berichte über *Scanning*, die Startstelle wird einzig über den Abstand zur TATA-Box definiert und kann nur in einem kleinen Bereich von etwa 5 bp variieren (Reiter et al., 1988; Hausner et al., 1991). Der *Scanning*-Mechanismus in Hefe und dessen Untersuchung durch mehrere *B-reader helix* Mutanten (*S.c.* E62R, R64E, F66D, N68A/Q) (Bangur et al., 1997; Pardee et al., 1998; Cho und Buratowski, 1999; Zhang et al., 2002) diente der Bestätigung der *B-reader helix* -Orientierung in der RNAP *Cleft*. Darüber hinaus wird in *S. cerevisiae* der *B-reader loop* Rest V79 zu Leucin mutiert, welches das Arginin an Position 78 stören soll. Diese Mutation wurde bereits *in vivo* charakterisiert und ist spezifisch in Abhängigkeit von der DNA-Sequenz um den Startpunkt an der Bestimmung des Transkriptionsstartes beteiligt (Faitar et al., 2001).

Transkription mit temperatursensitivem nuklearen Extrakt an der Fusionsmatrize HIS4-SNR14 zeigt, dass die TFIIB-Mutanten R64E und F66D eine Verschiebung der Startstellen-Präferenz von Position +1u zu +7d bewirken. Die Position N68 scheint keinen Einfluss auf die Startstellenselektion zu besitzen, auch wenn die Aktivität durch die Mutation insgesamt vermindert ist. Mit Mutante E62R konnte unter unseren Bedingungen kaum Transkription nachgewiesen werden. Auch wenn während der Reinigung keine Anzeichen auf

Präzipitation hinwiesen, kann Missfaltung und Instabilität bei Inkubation im nuklearen Extrakt nicht ausgeschlossen werden. Die *B-reader loop* Mutanten verlieren die Präferenz für die erste Startstelle ebenfalls und verringern insgesamt die Aktivität stark (Abb. 34 a). Die Befunde sind konsistent mit Berichten über Richtung stromabwärts verschobener Startstellen-Nutzung bei diesen Mutanten *in vivo* (Pinto et al., 1994; Bangur et al., 1997; Pardee et al., 1998; Cho und Buratowski, 1999; Faltar et al., 2001; Zhang et al., 2002). Insgesamt ist die Aktivität mit den *B-reader* Mutanten im Einklang mit den *in vivo* beobachteten Effekten auf die Wachstumsrate (s. Abb. 30). Die Verwendung der doppelten Menge an mutanten TFIIBs hatte keinen stimulierenden Effekt auf die Transkription oder eine Veränderung in der Startstellennutzung zur Folge (nicht gezeigt).

Analyse der *B-Linker* Mutanten

Die *B-linker strand* Alanin-Substitutionsmutante erlaubt im verwendeten *in vitro* System nur sehr geringe bis keine Transkriptionsaktivität (Abb. 34b, Spur 2). Dies ist konsistent mit der Letalität dieser Mutante *in vivo*. Unter den *B-linker helix* Mutanten bewirkt die Deletion der α -Helix *in vitro* einen weniger gravierenden Effekt als die Substitution von L110 durch den Helix-brecher Prolin (Abb. 34b, Spur 3 und 4). *In vivo* hingegen besitzt die L110P Mutante keinen, und die Δ linker helix Mutante einen sehr schwachen Wachstumsdefekt (vgl. Abb. 30 und Tab. 2). Der Mechanismus zur Startstellen Selektion ist bei keiner der *B-linker* Mutanten außer Kraft gesetzt, die Präferenz für +1u bleibt bei stark beeinträchtigter Aktivität erhalten. Ein endgültiger Beweis, dass das *B-linker* Element von TFIIB in *S. cerevisiae* ebenfalls bei der Öffnung des Promotors eine Rolle spielt, wäre durch *in vitro* KMnO₄-Footprints zu erbringen, welche aber bislang im *S. cerevisiae* System nur *in vivo* gelungen sind.

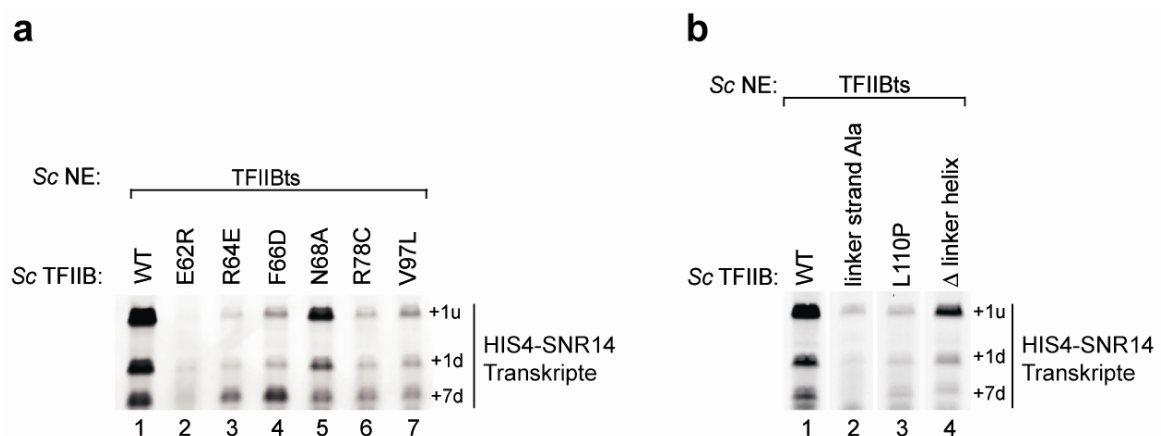


Abb. 34. Transkription mit mutanten TFIIBs von *S. cerevisiae*. Nuklearer Extrakt der temperatursensitiven Hefemutante G41E-TFIIB (*Sc NE* TFIIBs) wird mit 5 pmol der angegebenen TFIIB-Mutanten (*Sc TFIIB*) komplementiert. +1u, +1d und +7d sind Transkriptionsstarts des SNR14-Initiators (vgl. Abb. 31). **(a)** Mutanten im *B-reader* von TFIIB beeinträchtigen die Startstellenselektion: die Präferenz des +1u Starts verschiebt sich stromabwärts zugunsten des +7d Starts, vor allem bei den TFIIB R64E und F66D Mutanten. **(b)** Die Transkriptionsaktivität durch Mutation im *B-linker strand* sowie in der *B-linker helix* ist stark vermindert, die Startstellenpräferenz bleibt erhalten.

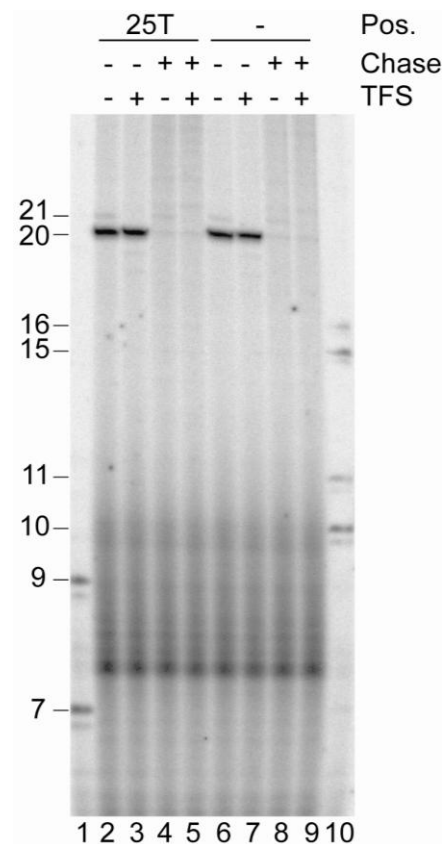
1. Umstrukturierung der RNAP beim Übergang von Initiation zu Elongation

2. Der APB-Crosslinker bewirkt keine Arretierung von Elongationskomplexen

Zunächst wird getestet, ob der Einbau des relativ großen APB-Crosslinker Moleküls in der DNA stromabwärts des aktiven Zentrums einen Einfluss auf die Wiederaufnahme der Transkription von bei Position 20 gestellten (EC20-) Komplexen hat. Für diesen Versuch wird die Matrize 25T (APB-Crosslinker an Position 25 des kodierenden Stranges) herangezogen.

Die Herstellung der Matrize erfolgt wie für die *Crosslinking* Experimente, mit Ausnahme dass die DNA nicht intern radioaktiv markiert wird. Der Versuch selbst wird ebenfalls unter *Crosslinking* Bedingungen, also in Gegenwart eines Überschusses an spezifischem und unspezifischem DNA-Kompetitor durchgeführt (s. (Grünberg et al., 2010) und Methoden). Abb. 36 zeigt, dass unter diesen Versuchsbedingungen kaum ein Überlesen bis Position 21 stattfindet. Außerdem bewirkt die Gegenwart von TFS dass dieser Fehleinbau korrigiert wird. Im Chase zeigt sich, dass quantitativ und vor allem unabhängig von TFS alle gestellten Komplexe die Elongation fortsetzen. Dieser Versuch belegt, dass die Gegenwart des APB-Crosslinkers in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums keine Arretierung gestellter Komplexe verursacht.

Abb. 36. Unter Crosslinking-Bedingungen werden keine arretierten Komplexe gebildet. Verglichen wurde die Bildung gestellter Komplexe bei Position 20 und anschließendem Chase (Spuren 4, 5, 8 und 9) in An- (+) und Abwesenheit (-) von TFS an einer Matrize ohne (Spuren 6-9) und mit Crosslinker an Position 25 im kodierenden Strang (25T, Spuren 2-5). Ist TFS nicht in der Reaktion vorhanden, entsteht eine geringe Menge einer 21 nt RNA durch Falscheinbau am G-Stopp, welches nicht effektiv verlängert wird. Spuren 1 und 10 enthalten die links beschriebenen RNA-Größenmarker.

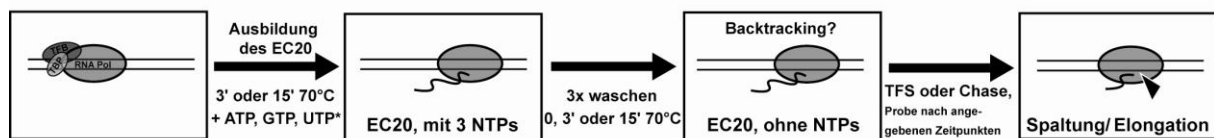


3. Kinetik der TFS induzierten RNA-Spaltung

In Gegenwart von Nukleotiden bewirkt TFS an gestellten Komplexen, dass falscheingebaute Nukleotide korrigiert werden, da nach induzierter RNA-Spaltung die RNAP wieder Nukleotide einbaut (Abb. 36, Spur 1 und 2). In Abwesenheit von Nukleotiden findet keine Synthese statt, so dass TFS induzierte RNA-Spaltprodukte direkt nachweisbar werden. Bei *Backtracking* würde man annehmen, dass TFS induzierte Spaltung zur Freisetzung von längeren RNA-Produkten führt, wie dies bereits bei TFIIS induzierter Spaltung in eukaryotischen Systemen und GreA/B induzierter Spaltung im bakteriellen

System beobachtet wurde (Wind und Reines, 2000; Fish und Kane, 2002). Eine Kinetik der TFS induzierten RNA-Spaltung an gewaschenen EC20-Komplexen in Gegenwart von TFS zeigt, dass unter allen getesteten Bedingungen das erste entstehende Produkt ein 18 nt langes RNA-Fragment ist, bevor weiter einzelne Nukleotide des Transkriptes gespalten werden. Die Spaltungsreaktion stoppt schließlich bei 13 nt. Dies ist konsistent mit der beobachteten Dinukleotidfreisetzung bei TFS-induzierter RNA-Spaltung im *M. jannaschii* System (Hausner et al., 2000). Möglicherweise interferiert die Bindung von TBP und TFB an den Promotor mit dem vollständigen Abbau des Transkripts. Das entstehende Abbaumuster verändert sich nicht in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer des Elongationskomplexes mit oder ohne Nukleotide vor TFS-Zugabe (Abb. 37). Dies zeigt, dass die Stabilität des Komplexes sowohl mit also auch ohne Nukleotide über 15 min gegeben ist. Die *Crosslinking*-Experimente wurden in weniger als 15 min durchgeführt. Im Chase Experiment wird deutlich, dass EC20-Komplexe auch nach TFS induzierter Spaltung transkriptionskompetent bleiben (Abb. 37, Spur 7-11).

a



b

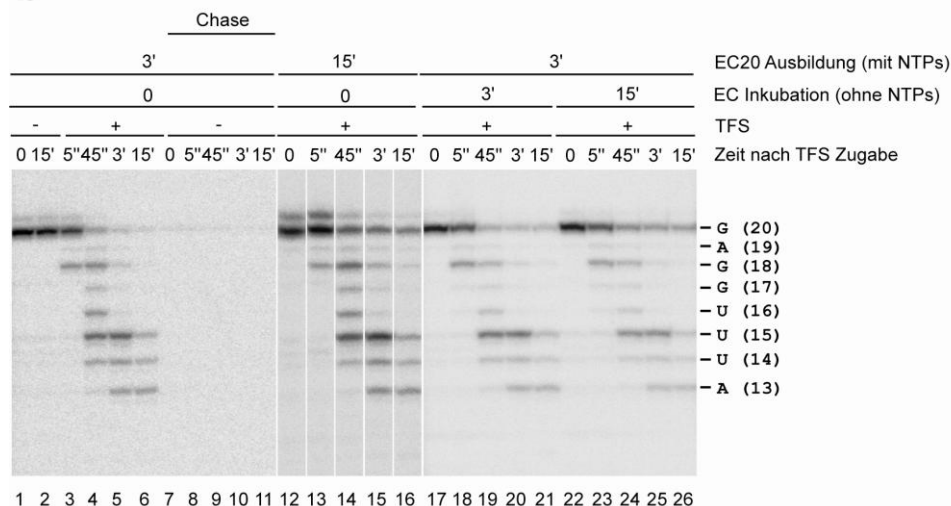


Abb. 37. Kinetik der TFS induzierten Spaltung. (a) Schematischer Versuchsaufbau. Elongationskomplexe werden bei Position 20 (EC20) an einer immobilisierten Matrize für 3 oder 15 min gestellt, mit Transkriptionspuffer ohne Nukleotide gewaschen und entweder sofort oder nach weiterer Inkubation ohne NTPs (3 oder 15 min) eine Probe entnommen (0) und TFS zugegeben. Weitere Proben wurden nach 5 und 45 sec, sowie nach 3 und 15 min entnommen. (b) Unter allen getesteten Bedingungen erfolgt der erste Schnitt präferentiell zwischen RNA-Positionen 17 und 18 (Dinukleotid), danach wird an jedem Nukleotid gespalten.

Dass es sich beim ersten Abbauprodukt tatsächlich um eine 18 nt langen RNA handelt, wird in einer Reaktion gezeigt, in der zusätzlich ATP vorhanden ist (Abb. 38). Das erste Spaltprodukt nach 5 sec ist wieder eine 18 nt lange RNA. Nach 15 sec wird ein Template-spezifischer Einbau von ATP an Position 19 erkennbar, von welchem aus quantitativ nur noch auf ein RNA-Fragment mit 17 nt geschnitten wird. Die folgenden Schnitte erfolgen ebenfalls präferentiell im Dinukleotidrhythmus. Unter der Annahme, dass ATP auch unspezifisch eingebaut wird, deutet dies darauf hin, dass TFS-induzierte Spaltung insbesondere dann zur Freisetzung eines Dinukleotides führt, wenn sie im Anschluss an das Inkorporieren eines Nukleotides stattfindet.

Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass *Backtracking* bei am *gdhC20*-Template gestellten RNAPs um maximal 2 Nukleotidpositionen auftritt.

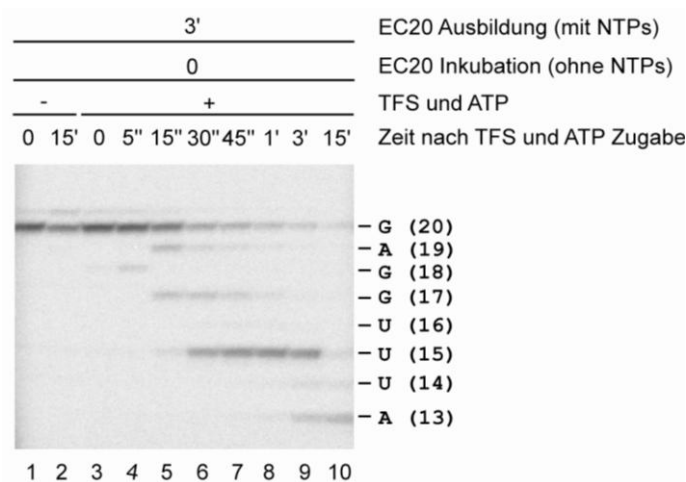


Abb. 38. Das erste Spaltungsprodukt nach Elongation ist ein Dinukleotid. Um zu zeigen, dass der erste Schnitt an einem Dinukleotid erfolgt, werden gestellte Komplexe mit TFS und ATP inkubiert, welches an Position 19 sequenzspezifisch eingebaut wird. Versuchsaufbau s. Abb. 37a.

4. Interne RNA-Spaltungsaktivität der RNAP von *P. furiosus*

Bei Markierung der RNA mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ anstelle von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-CTP}$ und anschließender Inkubation gewaschener EC20 Komplexe für 15 min, tritt ohne TFS-Zugabe ein 19 nt langes RNA-Spaltprodukt auf, bei entsprechender Markierung mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ hingegen ein 18 nt RNA-Spaltprodukt. Das Verhältnis von Spaltprodukt zu Volllänge RNA nimmt mit fallender Gesamtkonzentration von GTP bzw. ATP zu (Abb. 39, vgl. Spuren 2 und 5, bzw. 8 und 11). In vorhergehenden Versuchen wurde mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ markiert, wobei bei Inkubation ohne TFS keine RNA-Spaltung stattfand (Abb. 39, Spur 1 und 2). Da in den Reaktionen die jeweils nicht-radioaktiven Nukleotide im 10- bzw. 100-fachen Überschuss vorliegen, muss es an Positionen, die den Einbau des radioaktiv-markierten Nukleotides verlangen zu vermehrtem Falscheinbau kommen. Im nicht-kodierenden Strang enthält die Sequenz der *gdhC20*-Matrize an Position 19 ein Adenin, an Position 20 ein Guanin. Die interne Hydrolyse-Aktivität der *P. furiosus* RNAP scheint damit spezifisch auf den jeweiligen Falscheinbau in der Nähe des aktiven Zentrums mit RNA-Spaltung zu reagieren. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass das 3'-Ende der RNA nicht weiter als 1-2 Nukleotide vom aktiven Zentrum der RNAP

versetzt ist, da anderenfalls bei Markierung mit [α - 32 P]-GTP 17 und 16 nt, oder mit [α - 32 P]-UTP 15, 14 und 13 nt lange Spaltprodukte zu erwarten wären.

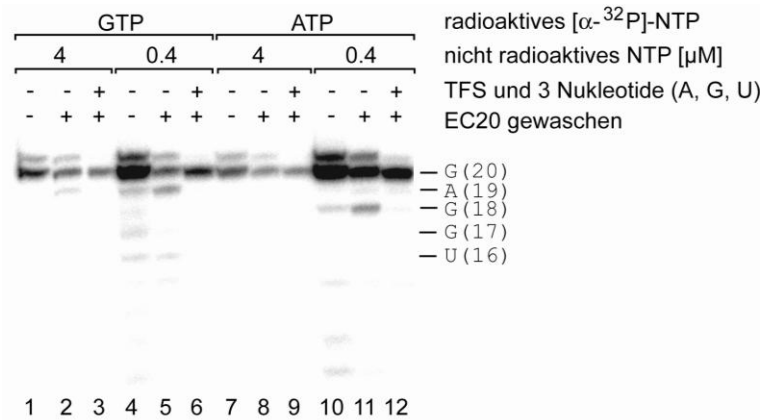
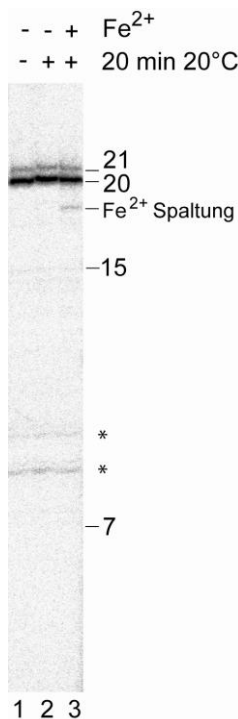


Abb. 39. Intrinsische Proofreading-Aktivität der archaeellen RNAP. Die RNA in gestellten EC20-Komplexen wurde mit [α - 32 P]-GTP oder [α - 32 P]-ATP in Gegenwart unterschiedlicher Mengen (4 oder 0,4 μ M) an nicht-radioaktivem GTP bzw. ATP markiert. Nach Waschen, wurden isolierte EC20 Komplexe für 15 min weiter bei 70°C inkubiert. Wenn nicht anders angegeben war die Konzentration der anderen NTPs 40 μ M.

5. Fe $^{2+}$ -Spaltung von RNA in gestellten Komplexen

Um weitere biochemische Evidenz in Hinblick auf den *Backtracking*-Status der gestellten Komplexe zu erhalten, wird an EC20-Komplexen eine Eisenspaltung nach (Nudler et al., 1997) durchgeführt. Es werden mittels immobilisierter Matrizen Elongationskomplexe gereinigt, exzessiv mit Puffer ohne Magnesium gewaschen, und anschließend mit einem Überschuss an Fe $^{2+}$ behandelt, was den Austausch des Mg $^{2+}$ im aktiven Zentrum zu Fe $^{2+}$ zur Folge hat. In Gegenwart von DTT kommt es zur lokalisierten Bildung von Hydroxylradikalen, welche Nukleinsäuren und Proteine in unmittelbarer Nähe spalten (Zaychikov et al., 1996). Dieses Experiment erlaubt es daher genau festzustellen, um wie viele Nukleotide das RNA-3'-Ende gegenüber dem aktiven Zentrum der RNAP versetzt ist und lässt so Rückschlüsse auf den *Backtracking*-Status des ECs zu (Nudler et al., 1997).



In Abb. 40 ist gezeigt, dass durch 20 minütige Inkubation mit oder ohne DTT (Spur 1 und 2) bei 20°C kein signifikanter RNA-Abbau auftritt. Durch Fe $^{2+}$ wird hingegen Spaltung induziert, und zwar zwischen Position 18 und 19 oder 17 und 18. Das Laufverhalten dieser RNA ist abweichend, da es durch die Fe $^{2+}$ -Spaltung ein zusätzliches Phosphat am 3'-Ende trägt (Nudler et al., 1997). Mit diesem Ergebnis wird somit wiederum bestätigt, dass kein signifikantes *Backtracking* bei an Position 20 des *gdhC20*-Promotors gestellten Komplexen auftritt.

Abb. 40. Eisenspaltung von RNA an gestellten Komplexen. Komplexe werden gestellt, fünf Mal mit Transkriptionspuffer ohne Nukleotide und ohne Mg $^{2+}$ gewaschen. Die Reaktion wird gedrittelt, und entweder nicht weiter inkubiert (Spur 1), in Gegenwart von DTT (Spur 2) oder in Gegenwart von DTT und Fe $^{2+}$ (Spur 3) für 20 min bei 20°C inkubiert. Das Spaltprodukt ist 18-19 nt lang. Die Sterne zeigen unspezifisch auftretende Banden.

6. RNA-Elongation und Spaltung an Elongations-Scaffolds

Um zu untersuchen, ob TFS auch längere 3'-Überhänge spalten kann, wird versucht *Backtracking* an synthetischen Templates nachzustellen (Abb. 41). Ausgehend von dem in den *Crosslinking* Versuchen verwendeten *Scaffold a* (Kireeva et al., 2000), werden zusätzliche Nukleotide am 3'-Ende der RNA eingeführt, die zu einer Fehlpaarung mit dem Template-DNA-Strang führen. *Scaffold b* besitzt einen 1 nt langen Überhang, *Scaffold c* einen 5 nt Überhang am 3'-Ende. Assemblierte Elongationskomplexe werden dabei über ein 5'-Biotin am Non-Template-DNA-Strang isoliert und nach mehrmaligem waschen mit Nukleotiden bzw. TFS und Nukleotiden inkubiert. Durch Inkubation der assemblierten Komplexe mit drei Nukleotiden (ATP, GTP und UTP), wird bis zum nächsten Guanin im kodogenen Strang elongiert (G-Stopp). Da die 19 nt lange RNac (von *Scaffold c*) dieselbe elektrophoretische Mobilität besitzt wie die 20 nt RNA, die bei korrekter Transkription ausgehend von RNAA/b bis zum ersten G-Stopp gebildet wird, werden die Nukleotidkonzentrationen so gewählt, dass partielles Überlesen möglich ist.

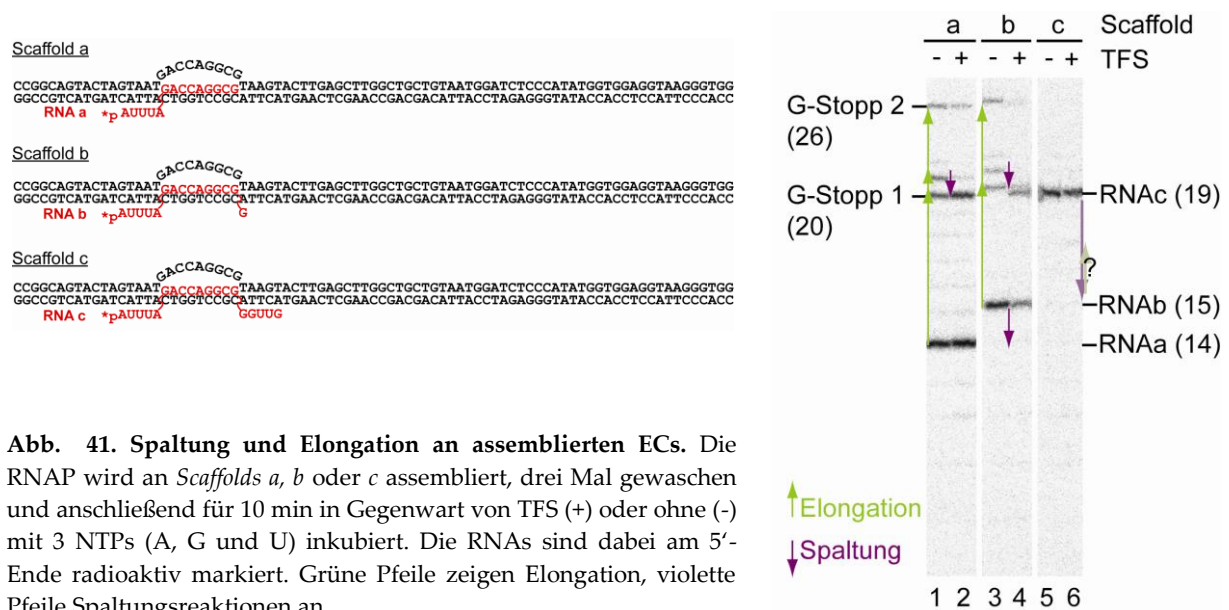


Abb. 41. Spaltung und Elongation an assemblierten ECs. Die RNAP wird an *Scaffolds a, b* oder *c* assembliert, drei Mal gewaschen und anschließend für 10 min in Gegenwart von TFS (+) oder ohne (-) mit 3 NTPs (A, G und U) inkubiert. Die RNAs sind dabei am 5'-Ende radioaktiv markiert. Grüne Pfeile zeigen Elongation, violette Pfeile Spaltungsreaktionen an.

Das Ergebnis zeigt, dass die *Scaffolds a* und *b* ohne TFS elongiert werden, der Falscheinbau eines Nukleotides also bei den gewählten NTP-Konzentrationen nicht mit der Elongation interferiert. *Scaffold c* hingegen wird nicht verlängert. Darüber hinaus ist die Bindung der RNAP weniger stabil, was an der verringerten Menge isolierter RNA zu erkennen ist. In Gegenwart von TFS wird bei *Scaffold a* der Falscheinbau beim ersten G-Stopp korrigiert (Abb. 41, Spur 4). *Scaffold c* hingegen wird auch in Gegenwart von TFS nicht verlängert, was bedeutet, dass Spaltung an diesem 3'-Überhang nicht möglich ist. Außerdem sind in Abwesenheit von Nukleotiden - im Gegensatz zu *Scaffold a* und *b* - an *Scaffold c* keine Spaltprodukte zu sehen (nicht gezeigt).

V) Diskussion

A) Mechanismus der Transkriptionsinitiation

Die in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Experimenten im archaeellen und später im *S. cerevisiae* Transkriptionssystem bestätigen die strukturellen Ergebnisse einer Pol II-TFIIB Röntgenkristallstruktur und ergänzen diese beträchtlich durch funktionelle Daten. Zusammengefasst liefern die gewonnenen strukturellen und funktionellen Informationen ein neues Modell für den Ablauf der Transkriptionsinitiation in Archaeen und Eukaryoten (Kostrewa et al., 2009).

Der zu Beginn der Analyse vorgenommene Wechsel in das archaeelle System brachte mehrere Vorteile mit sich. Aufgrund seiner Einfachheit gegenüber dem eukaryotischen System ist das archaeelle Modell experimentell leichter zugänglich und es sind in unserem Labor bereits viele *in vitro* Assays etabliert (Hethke et al., 1996; Bartlett et al., 2000; Spitalny und Thomm, 2003; Bartlett et al., 2004; Lange und Hausner, 2004; Goede et al., 2006; Naji et al., 2008; Spitalny und Thomm, 2009). Die archaeelle RNAP aus Hyperthermophilen kann aus einzelnen rekombinanten Untereinheiten rekonstituiert werden (Werner und Weinzierl, 2002; Naji et al., 2007), was bislang in noch keinem mesophilen Organismus gelungen ist. Das archaeelle System stellt damit einen Zugang zur Untersuchung von potentiell letalen RNAP-Mutationen dar. Auch wenn es bis heute keine Kristallstruktur der *P. furiosus* RNAP gibt, haben Cryo-EM Daten der *P. furiosus* RNAP (Kusser et al., 2008) und mittlerweile die Kristallstrukturen von RNAPs aus Crenarchaeen gezeigt (Hirata et al., 2008; Korkhin et al., 2009), dass die Gesamttopologie des Enzyms im Vergleich zur Hefe Pol II hochkonserviert ist. Darüber hinaus stellt der essentielle Initiationsfaktor TF(II)B in beiden Domänen ein einzelnes Polypeptid dar und ist ebenfalls sehr gut konserviert (28% Identity, 46% Similarity zwischen *P. furiosus* TFB1 und *S. cerevisiae* TFIIB, Ergebnis nach BLAST (Altschul et al., 1997)).

1. Die Rolle des B-readers

Die Deletion von 20 Aminosäuren im *B-reader*, welche entsprechend einer früheren TFIIB-RNAP Struktur als *B-Finger* bezeichnet wurde (TFB-Mutante ΔB -Finger), hatte einen schwerwiegenden Defekt bei der Promotoröffnung zur Folge. Die Zugabe von TFE konnte das sehr schwache KMnO₄-Footprint Signal verstärken (Naji et al., 2007), jedoch nur im stromaufwärts Bereich der Transkriptionsblase (Abb. 14). Während im Run-Off Test keine Aktivität mit dieser Mutante zu verzeichnen war, konnte im abortiven Test eine sehr geringe Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 13). Dies zeigt, dass die Promotoröffnung schwer kompromittiert, jedoch nicht vollkommen abhanden gekommen ist. Die Daten zur ΔB -Finger Mutante können dadurch erklärt werden, dass bei Fehlen des *B-readers*, jedoch intaktem *B*-

linker, eine Transkriptionsblase gebildet wird, diese jedoch nicht ausreichend stabilisiert werden kann und immer wieder kollabiert. Da TFE im Initiationskomplex selektiv einen *Crosslink* mit dem Non-Template-Strang im Bereich -9 relativ zum Transkriptionsstart bildet (Grünberg et al., 2007), gehen wir davon aus, dass TFE den transient einzelsträngig vorliegenden Non-Template Strang sozusagen auffängt, und dadurch die Transkriptionsblase am stromaufwärts Ende fixiert. Dies reicht aus, um die Run-Off Aktivität teilweise wieder herzustellen (Abb. 19). Versuche mit vorgeöffneten Matrizen zeigen, dass die Initiation mit allen *B-reader* Mutanten am richtigen Startpunkt stattfindet (Abb. 21). Dies impliziert dass die archaeele RNAP selbst Kontakte zum Purin-Pyrimidin Basenpaar am Transkriptionsstart herstellt. Der *B-reader* könnte demnach benötigt werden um eine Initiator-Bindestelle am aktiven Zentrum freizulegen.

Im KMnO₄-Footprint verstärkt TFE das -Signal an Position -6 sehr stark, an Position -4 und -2 gut und überhaupt nicht mehr an Position +2 und +3 (Abb. 14 und Abb. 20). Eukaryotisches TFIIE α kann unabhängig von der TFIIF Bindung die Öffnung des Promotors stimulieren (Holstege et al., 1995), wahrscheinlich indem es mit dem stromaufwärts Ende einer partiell geöffneten Transkriptionsblase interagiert (Robert et al., 1996). Die Transkriptionsblase wird also im wildtypischen PIC an einem Ende von TFE, am anderen vom *B-reader* stabilisiert.

In der endgültigen Auflösung der Pol II-TFIIF Struktur wird ersichtlich, dass in etwa die N-terminale *B-reader* Hälfte eine α -Helix bildet, während die C-terminale Hälfte mobil ist. Der Kristall wurde in Gegenwart eines Nukleinsäure-Gerüsts bestehend aus Template-Strang, Non-Template-Strang und einer 9 nt RNA angesetzt, kristallisierte jedoch ohne Nukleinsäuren aus (Kostrewa et al., 2009). Es ist anzunehmen, dass die von TFIIF besetzte RNAP *Cleft* nicht zusätzlich ein 9 nt DNA-RNA Hybrid (Kireeva et al., 2000; Westover et al., 2004) aufnehmen kann. Möglicher Weise wird der *B-reader loop* im PIC bei Bindung des Template-Stranges in der DNA-bindenden Spalte fixiert.

Um genauer zu definieren welcher Bereich des *B-readers* die notwendigen Interaktionen zur Stabilisierung des stromabwärts Endes der Transkriptionsblase vermittelt, wurden sowohl Mutationen in der *B-reader helix* als auch im *B-reader loop* untersucht. Zwei konservierte Arginine in je einer der beiden *B-reader* Abschnitte wurden dazu verändert (R45 und R57 in *P. furiosus* TFB, R64 und R78 in *S. cerevisiae* TFIIF, Abb. 17). Grundlage für die Auswahl dieser Reste ist einerseits ihr hoher Grad an Konservierung und andererseits deren Einfluss auf die Transkriptionsstartstellen-Selektion in Eukaryoten (Pinto et al., 1994; Bangur et al., 1997). Auch wenn die schwerwiegende Mutation R45E in der *B-reader helix* bereits einen schwächenden Einfluss auf die Öffnung am Transkriptionsstart hat, verhindert eine 5-Aminosäuren-Deletion im *B-reader loop* sowie die Punktmutanten R57E oder R57A die Öffnung am Transkriptionsstart zur Gänze (Abb. 20). Dies zeigt, dass vor allem die vorhergesagte *B-reader loop* Spitze für die Öffnung des Transkriptionsstartes notwendig ist, während der *B-reader* insgesamt zur Stabilisierung des Template-Stranges beiträgt.

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten *B-reader* Mutanten konnten im KMnO₄-Footprint sowie im Run-Off Test durch TFE stimuliert werden (Abb. 20). Über die

funktionelle Komplementation zwischen TFB und TFE wurde bereits früher in einer Arbeit von (Werner und Weinzierl, 2005) berichtet. Deren untersuchte TFB-Varianten von *M. jannaschii* hatten ebenfalls Mutationen im *B-reader* sowie im *B-ribbon*. Ebenfalls passend zu diesem Ergebnis ist, dass TFE die Transkription mit TFB2 von *P. furiosus* stimuliert (Micorescu et al., 2008). TFB2 weist einen stark verkürzten *B-reader* und *B-linker* Bereich auf, wobei die *B-reader helix* und die *B-linker helix* vorhanden sind, jedoch die Sequenz dazwischen mit *B-reader loop*, *B-linker turn* und *B-linker strand* durch eine kurze Aminosäuresequenz ohne erkennbare Homologie zu anderen TFBs ersetzt ist (vgl. Alignment Abb. 3). Im Run-Off Test, bei Transkription an geschlossenen Matrizen sowie im KMnO₄-Footprint ermöglicht TFB2 eine gegenüber TFB1 nur verringerte Aktivität, welche in diesen Tests durch TFE stimuliert werden kann. Auf einem Heteroduplex Template mit einem Fehlpaarungsbereich von 12 bp wie in *Bubble1*, wird die Aktivität mit TFB2 unabhängig von TFE stimuliert, ähnlich zu den *B-reader* Mutanten von TFB1. Domänen-Austauschexperimente zwischen TFB1 und TFB2 legen weiter nahe, dass der *B-reader* und TFE teilweise redundante Funktionen besitzen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, besteht die Redundanz in der Stabilisierung der Transkriptionsblase im offenen Komplex (Micorescu et al., 2008). Die hier gezeigten Arbeiten können dies vor allem durch das Fehlen des *B-reader loops* in TFB2 erklären.

Es wurde außerdem berichtet, dass TFB von *M. jannaschii* Promotor-unspezifisch die Transkription an aktivierten Templates (d.h. an Nuklease-behandelter DNA) stimuliert. TFB verstärkt darüber hinaus die sequenzspezifische Interaktion zwischen RNAP und einzelsträngiger DNA. Beide Effekte konnten durch Deletion des „*B-Fingers*“ zunichte gemacht werden (Werner und Weinzierl, 2005). In Verbindung mit unseren Ergebnissen sind diese Daten auf eine Stabilisierung des Template-Stranges durch den *B-reader loop* am aktiven Zentrum zurückzuführen.

In derselben Arbeit wurde weiter beobachtet, dass die Deletion des *B-Fingers* Initiationskomplexe destabilisiert. Eine ebensolche Auswirkung hatte die TFB Mutante R92E von *M. jannaschii*, welche der R57E Mutante in *P. furiosus* TFB entspricht. Dies steht im Widerspruch zu den hier gezeigten Ergebnissen, in denen TFB Mutationen im *B-reader* oder *B-linker* keinen Einfluss auf die Initiationskomplex-Stabilität besitzen (Abb. 12 und 18). Diese Diskrepanz kann im Falle der Deletionsmutante durch das vollständige Entfernen des vorhergesagten „*B-Finger*“-Abschnitts von *M. jannaschii* TFB erklärt werden, wodurch der *B-ribbon* direkt an den *B-linker* anschließt und so vermutlich PICs topologisch nicht korrekt ausgebildet werden können. In unserer ΔB -*Finger* Mutante bleiben sechs Aminosäuren nach dem *B-ribbon* sowie der gesamte *B-linker turn* erhalten. Nach den nun vorliegenden Strukturdaten könnten bei dieser Deletion *B-linker* und damit auch der *B-Core* im PIC korrekt positioniert werden. Um die widersprüchlichen Daten der *M. jannaschii* R92E und *P. furiosus* R57E Mutanten zu erklären, können Unterschiede in der Promotorbeschaffenheit in Erwägung gezogen werden. Während wir alle Versuche am Glutamatdehydrogenase (*gdh*)-Promotor durchgeführt haben, wurde in der zitierten Arbeit der virale SSV T6 Promotor verwendet. Der *B-reader* interagiert möglicher Weise Sequenz-abhängig mit der Promotor-

DNA (s. unten) und könnte so die Stabilität des Initiationskomplexes abhängig vom Promotor mehr oder weniger beeinflussen.

Im Einklang mit unseren Ergebnissen steht der Befund, dass eine Deletion von acht Aminosäuren im *B-reader* des *T. kodakaraensis* TFB2 nur eine geringfügig verminderte Aktivität bei Aufhebung der abortiven Transkription zur Folge hatte (Santangelo et al., 2007). Die Aktivität der Mutante ist damit den R45E bzw. R45A Varianten des *P. furiosus* TFB sehr ähnlich. In der Arbeit wurde die vorhergesagte „*B-Finger*“-Spitze deletiert (die entsprechenden *P. furiosus* Reste sind D48-R55). Nach dem nun erstellten PIC-Modell (Kostrewa et al., 2009) handelt es sich beim deletierten Bereich nicht um die Spitze sondern die Flanke des *B-reader loops*. Das von uns als entscheidend befundene Arginin (*P. furiosus* R57) wurde nicht verändert. Dass bei partieller Deletion des *B-reader loops* die entscheidenden Reste während der Initiation trotzdem wirken können, kann als Hinweis auf die Flexibilität des *B-reader loops* gedeutet werden. Dies geht auch konform mit den häufig in archaeellen TFB2-Sequenzen auftretenden kurzen Deletionen im *B-reader*.

Abgesehen von früheren und den hier gezeigten archaeellen Daten, gibt es in Hefe zahlreiche Anhaltspunkten, die eine Interaktion der Aminosäuren um R78 (*P. furiosus* R57) mit dem Transkriptionsstartpunkt nahe legen. Arginin R78 (*P. furiosus* R57) wurde mehrmals in Screenings nach Startstellenselektions-Mutanten in *S. cerevisiae* erfasst (Pinto et al., 1994; Bangur et al., 1997; Faitar et al., 2001). Bei Mutation des nebenstehenden Restes (V79L) kommt es ebenso zur Verschiebung der Startstelle und zwar in Abhängigkeit von DNA-Mutationen spezifisch an Position -1/+1 (Faitar et al., 2001). Der Hefestamm TFIIB-R78C ist sensitiv auf NTP-Depletion und NTP-Depletion *in vivo* kann eine Verschiebung der Startstellennutzung verursachen (Bangur et al., 1997; Chen und Hampsey, 2004). Die Mutante R92E von *M. jannaschii* erwies sich ebenfalls als sensitiv in Hinblick auf die NTP Konzentration *in vitro*, jedoch ohne die Startstellenselektion zu beeinflussen (Werner und Weinzierl, 2005). Darüber hinaus erinnert dies an den Sigma $\sigma_{3.2}$ -Linker, welcher über *Crosslinking* am aktiven Zentrum der bakteriellen RNAP lokalisiert wurde und dessen Mutation ebenfalls zu Sensitivität gegenüber der NTP-Konzentration führt (Severinov et al., 1994).

Da die Hefe TFIIB-Doppelmutante E62R-R78E lebensfähig ist, also die E62R-Mutation die Letalität der R78E Mutation kompensiert, wird zwischen den beiden Resten eine Salzbrücke vermutet. Bei R78-Substitution durch Cystein oder Leucin bleibt die Hefe lebensfähig (Bangur et al., 1997; Faitar et al., 2001), auch wenn dies ebenfalls die putative Salzbrücke zerstören würde. Im Komplex mit Pol II spielt die scheinbare Salzbrücke in TFIIB allerdings keine Rolle. Vieles deutet darauf hin, dass TF(II)B in einer offenen und geschlossenen Konformation vorliegen kann (Deng und Roberts, 2007). Möglicherweise spielt diese Salzbrücke nur in der geschlossenen, RNAP ungebundenen TF(II)B-Konformation eine Rolle.

Abgesehen von R78 im *B-reader loop* von Hefe TFIIB, haben Screenings nach Startstellenselektionsdefekten ebenfalls Reste der *B-reader helix* identifizierten (Pinto et al., 1994; Bangur et al., 1997; Faitar et al., 2001). Zur Untersuchung des *Scanning* Phänomens in *S. cerevisiae* wurde eine Fusionsmatrize entworfen, bestehend aus dem HIS4 Core-Promotor

und dem SNR14-Initiator (Ranish et al., 1999; Kuehner und Brow, 2006). Unsere Promotor-Analyse hatte gezeigt, dass ein Adenin an Position -8 oder an -7 relativ zum Transkriptionsstart für die Initiation *in vitro* entscheidend ist (Abb. 31). Die Funktion von rekombinant hergestellten TFIIB-Mutanten konnte mit nuklearem Extrakt aus *S. cerevisiae*, welches frei von funktionsfähigem endogenen TFIIB ist, getestet werden (Ranish et al., 1999) (Abb. 32). Die *B-reader loop* Mutanten R78C und V79L haben wir mit vier *B-reader helix* Mutanten verglichen, deren Seitenketten jeweils in eine andere Richtung senkrecht zur Helixachse orientiert sind. Die deutlichsten Verschiebungen der Startstellenpräferenz Richtung stromabwärts wurden durch Mutagenese von R64 (*P. furiosus* R45) und F66 in der *B-reader helix* erzielt (Abb. 34). Die R45E Mutante in *P. furiosus* führte zu verminderter Aktivität in allen *in vitro* Assays (Abb. 19, 20, 21, 23, 24). Die Mutante A49N besitzt in allen Tests Wildtypaktivität, während die entsprechende N68A TFIIB Mutante in *S. cerevisiae* keinen Startstellendefekt besitzt (Abb. 34). Mutation E62R in Hefe TFIIB hat in unserem System einen nahezu kompletten Aktivitätsverlust *in vitro* zur Folge (Abb. 34). *In vivo* verursachte diese Mutation unter allen getesteten Punktmutationen den schwerwiegendsten Wachstumsdefekt (vgl. Abb. 30). Zusammen mit den KMnO₄-Footprints im *P. furiosus* System (Abb. 20) weisen diese Daten darauf hin, dass die *B-reader helix* auch zur Stabilisierung des Template-Stranges im offenen Komplex beiträgt, jedoch nicht direkt am Transkriptionsstartpunkt. Da sich die *B-reader helix* und das konservierte Thymin an Position -8 des kodogenen Stranges im Modell für den offenen Komplex in direkter Nähe zueinander befinden (Kostrewa et al., 2009) (Abb. 16), gehen wir von einer Interaktion der beiden Startstellendeterminanten bei der Initiation der Transkription aus.

In Archaeen gibt es bisher keine Hinweise auf Konservierung eines Adenins an Position -8 oder -7, jedoch zeichnet sich das PPE bis etwa 10 bp stromaufwärts des Startpunktes durch einen hohen AT-Gehalt aus (Reiter et al., 1988; Thomm und Wich, 1988; Hain et al., 1992). Die Transkriptionseffizienz am 16/23S rRNA Promotor in *S. shibatae* ist unterschiedlich, je nachdem ob die Sequenz durch Poly-A oder Poly-T ersetzt wird (Hain et al., 1992). Daher ist anzunehmen, dass auch in Archaeen die RNAP bzw. TFB sequenzspezifische Interaktionen mit dem PPE-Element eingehen. In einem kürzlich erschienenen Vergleich von *M. jannaschii* Promotoren konnte keine klar definierte Sequenz für dieses Element identifiziert werden (Zhang et al., 2009). Denkbar ist, dass es unterschiedliche PPE-Klassen gibt, welche aus einer bestimmten Adenin-Thymin-Kombination bestehen und in Summe in den Sequenzvergleichen nicht aufscheinen. Eine eingehendere Analyse des PPE in Kombination mit der Untersuchung möglicherweise komplementärer TFB-Mutanten könnten in Zukunft Aufschluß über die Interaktionen zwischen Template-DNA und TFB geben.

2. Die Rolle des B-Linkers

Der *B-linker* wurde bisher als flexible, unstrukturierte Verbindung zwischen der *B-Finger* und der *B-Core* Domäne angesehen (Bushnell et al., 2004). Primärstrukturvorhersagen sowie die in dieser Arbeit präsentierten Mutationsanalysen haben bestätigt, dass es sich im

Gegensatz dazu um ein eigenständiges funktionelles Element in TF(II)B handelt, welches eine essentielle Funktion im Promotoröffnen besitzt. In der endgültigen Struktur von TFIIB wird bestätigt, dass der C-terminale *B-linker* Bereich eine α -Helix ausbildet, die laut Strukturvorhersagen in allen TFBs konserviert ist (Kostrewa et al., 2009). Funktionell war dieser Bereich bislang gänzlich uncharakterisiert.

Das aus den vorliegenden Strukturdaten resultierende PIC-Modell geht dabei mehr mit dem vorgeschlagenen Modell des Hahn-Labors (Chen und Hahn, 2004) als mit dem des Kornberg-Labors (Bushnell et al., 2004) konform. Die Daten der ortsspezifischen Hydroxylradikal Spaltungen ausgehend vom *B-reader* und *B-linker* (Chen und Hahn, 2004) in der *Cleft* werden durch das neue PIC-Modell erklärt (Abb. 42). Es bestätigt sich also, dass der *B-linker* nicht an der Oberfläche der RNAP-Hinterseite befindet.

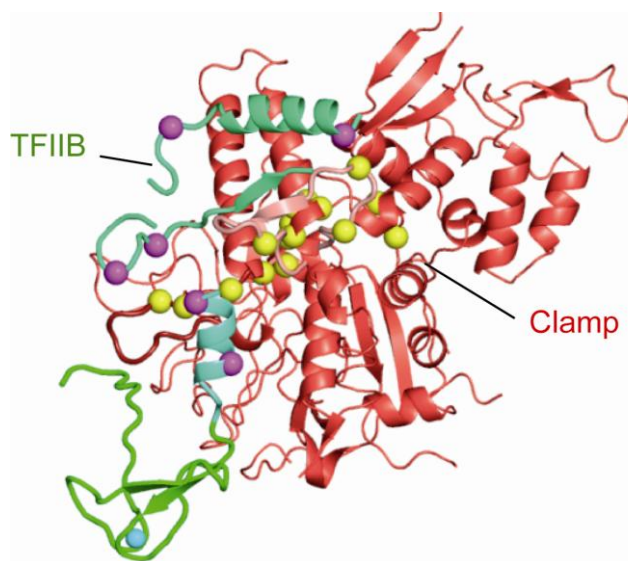


Abb. 42 Hydroxylradikal Spaltung an der Clamp ausgehend von *B-reader* und *B-linker*. In violett sind die Positionen in TFIIB (grün) gezeigt, in denen Hydroxyl-Radikal Reste eingebaut wurden. Die resultierenden Spaltungspositionen in Rpb1 befinden sich an der Innenseite der Clamp (rot) (Chen und Hahn, 2004) und sind in gelb eingezeichnet. Die Abbildung stammt aus (Kostrewa et al., 2009).

Im *P. furiosus* TFB hatte eine putative Helix-Brecher Mutation (L92P) denselben Effekt wie die vollständige Deletion der *B-linker helix*, nämlich den Verlust der Promotoröffnungsaktivität bei normaler PIC-Stabilität (Abb. 12-14). Mutationen in der *B-linker helix* die weniger schwerwiegend waren (L92A, K88E) hatten einen insgesamt schwächenden Einfluss in allen *in vitro* Tests zur Folge (Abb. 12-14). Der KMnO_4 -Footprint zeigt, dass diese Mutanten eine gegenüber dem Wildtyp TFB schwächere Promotoröffnung erzeugen, wobei die Transkriptionsblase anders als etwa bei den *B-reader* Mutationen über den gesamten Bereich geöffnet vorliegt (vgl. Abb. 14 und 20). Die Einführung einer einzelnen Punktmutation in der topologisch benachbarten A'-Clamp Coiled-Coil der archaellen RNAP an einer von vier in Richtung aktives Zentrum gerichteten Aminosäuren verursacht ebenfalls einen Defekt in der Ausbildung des offenen Komplexes (Abb. 28). Die Promotoröffnungsaktivität kann damit erstmals einem klar definierten Bereich im eukaryotischen/ archaellen PIC zugeordnet werden (Abb. 44).

Die Effizienz der RNAP Bindung im PIC wurde von keiner *B-linker* Mutante in Mitleidenschaft gezogen, und auch alle mutanten RNAPs konnten einen PIC ausbilden (Abb. 26). Dies lässt darauf schließen, dass eine mögliche direkte Interaktion zwischen dem *Clamp Coiled-Coil* und dem *B-linker* erst nach der PIC-Assemblierung stattfindet, ohne dabei die PIC-Stabilität zu beeinflussen. Eine CD-Analyse des *B-linker* Fragmentes zeigt außerdem, dass dieses keine Sekundärstruktur ausbildet (pers. Kommunikation A. Jawhari). Dies wiederum spricht für induzierte Faltung im PIC.

Erst in der endgültigen TFB-Pol II Struktur wurde erkenntlich, dass der N-terminale Bereich des *B-linkers* ein β -Faltblatt mit *Rudder* bildet (*B-linker strand*) (Abb. 44) und sich damit etwa an einer Position befindet, die im Elongationskomplex vom Non-Template Strang besetzt wird. Etwas überraschend war, dass bereits eine Alanin-Substitutionsmutante des *B-linker strands*, bei der fünf hydrophobe Aminosäuren ersetzt wurden, wie die *B-linker helix* Mutanten die Fähigkeit zur Promotoröffnung *in vitro* verloren hatten (Abb. 20). Darüber hinaus ist die entsprechende Mutation in TFIIB für *S. cerevisiae* letal (Abb. 29). Der Bereich wurde bisher in keinem genetischen *Screen* entdeckt. Dies kann damit zusammenhängen, dass er erstens essentiell ist und zweitens keine Rolle bei der Startstellenselektion besitzt. Eine *Rudder*-Deletionsmutante der bakteriellen RNAP verursachte einen Promotoröffnungsdefekt welcher die Öffnung des stromabwärts Endes der Transkriptionsblase betrifft (Kuznedelov et al., 2002). Das archaeelle Δ *Rudder*-Enzym besitzt ebenfalls einen Promotoröffnungsdefekt (Naji et al., 2008). In den Versuchen mit Heteroduplex Templates lässt sich die Aktivität mit den *B-linker strand* Mutanten besser mit einer im Startbereich als mit einer stromaufwärts vorgeöffneten Transkriptionsblase wiederherstellen. Es ist daher anzunehmen, dass zusätzlich zum *B-reader loop* die *B-linker strand* - *Rudder* Wechselwirkung einen stabilisierenden Effekt auf das stromabwärts gelegene Ende der Transkriptionsblase ausübt.

Die *in vivo* und *in vitro* Tests der *B-linker* Mutationen in *S. cerevisiae* TFIIB sind auf den ersten Blick nicht gänzlich schlüssig. Deletion der *B-linker helix* kann *in vivo* beinahe vollständig kompensiert werden und die Helix-Brecher Mutante L110P (*P. furiosus* L92P) wächst wie der Wildtyp (Abb. 30 und Tab. 2). Rekombinantes L110P jedoch hat *in vitro* einen beinahe ebenso schweren Defekt wie die *B-linker strand* Alanin-Substitutionsmutante, während die Deletionsmutante des *B-linkers* eine lediglich verminderte Aktivität aufweist (Abb. 34). Im PIC Modell befindet sich die *B-linker helix* zwischen dem *Clamp Coiled-Coil* und *Protrusion* an der Oberfläche der *Cleft*, während der *B-linker strand* in der *Cleft* zwischen *Rudder* und *B-linker helix* eingeschlossen ist (Kostrewa et al., 2009) (Abb. 16). TFIIE und TFIIF befinden sich in räumlicher Nähe auf gegenüberliegenden Seiten der *Cleft* (Chen et al., 2007) und könnten daher potentiell die Defekte in der *B-linker helix* kompensieren. Wahrscheinlicher ist, dass *in vivo* ein anderer Faktor den starken *in vitro* Defekt der L110P Mutation aufhebt, denn TFIIE und TFIIF sind in nuklearen Extrakten ebenfalls vorhanden. Das Einführen eines Prolin-Restes und die damit verbundene eingeschränkte Flexibilität des *B-linker helix* Bereichs könnten für den schweren *in vitro* Defekt verantwortlich sein.

3. Versuche an vorgeöffneten Matrizen

Um die Interpretation der Ergebnisse an vorgeöffneten Transkriptionsblasen zu vereinfachen, wurde die erste Generation der für das *P. furiosus* System entworfenen Matrizen (*Bubble1*, siehe (Naji et al., 2008)) in zwei Schritten weiterentwickelt. Zunächst wurde mittels Herstellung des fehlgepaarten Bereiches durch Kopieren der Sequenz des transkribierten Stranges in den nicht-kodierenden Strang anstelle von umgekehrt, die Verwendung der normalen Startstelle wiederhergestellt (Abb. 21). Dies kann darauf hinweisen, dass der PIC mit der Startstelle des kodogenen Stranges sequenzspezifisch in Wechselwirkung tritt, und nicht mit dem nicht-kodogenen Strang. Weiter Mutationen im Promotorbereich wären jedoch notwendig um dies eindeutig festzustellen. Die Verlängerung an beiden Enden der synthetisch hergestellten DNA-Matrizen um 10 bzw. 20 bp verminderte darüber hinaus die Intensität der Transkriptionsstopps. Verkleinerung der Blase von 13 auf 3 Basenfehlpaarungen im Bereich des vorhergesagten Beginns der Promotoröffnung am stromaufwärts Ende der Transkriptionsblase bringt ebenfalls eine Verringerung der Transkriptionsstopps mit sich (Abb. 21). Zwei Ursachen wurden für die dennoch Faktoren-abhängig produzierten Stopps in Erwägung gezogen: i) Behinderung des *Promotor Escapes* durch Interferenz der Basenfehlpaarungen mit dem *Bubble-Reclosure* oder ii) die Länge der Matrize ist unzureichend um die Prozessivität zu garantieren. Da die Stopps selbst bei „geschlossenen“ synthetischen Matrizen ohne Basenfehlpaarungen auftraten war die Länge der DNA als Begründung zu favorisieren. Da Faktoren-unabhängig produziertes Transkript nicht eindeutig vom Run-Off unterschieden werden konnte, wurden die Transkriptionsstopps zur Evaluierung der TFB-Aktivität herangezogen.

Mittels PCR-basierter Amplifikation der Matrizen, selektiver Spaltung mit der λ -Exonuklease jeweils eines Einzelstranges und Rehybridisierung von Einzelsträngen (Thomas et al., 2002) konnten schließlich Templates hergestellt werden, die dieselbe Länge (zirka 300 bp) besitzen wie die für Standard-Run-Off Transkriptionen verwendeten Matrizen (Abb. 22). Das Ergebnis mit der stromaufwärts gelegenen Transkriptionsblase war sehr zufriedenstellend, da kaum zusätzliche Transkriptionsstopps auftraten, während die Startöffnung einige Abbrüche zur Folge hatte, vornehmlich bei einer Länge von 14 und 17 nt (Abb. 23). Die 14 nt lange RNA war auf Faktoren-unabhängige Transkription zurückzuführen. Die 17 nt lange RNA sollte bereits aus dem Hybrid getrennt sein (Westover et al., 2004). Es ist denkbar dass dies aufgrund der Basenfehlpaarung der vorgeöffneten Transkriptionsblasen erschwert ist. Im abortiven Test an den vorgeöffneten Matrizen wurde ohne TBP und TFB keine Trinukleotid synthetisiert. Daher ist dies ein sehr eindeutiger und aussagekräftigster Test (Abb. 24 und nicht gezeigt).

Die *B-reader loop* Mutanten erreichten in Bubble L2 durch Voröffnung der gesamten Transkriptionsblase WT-Aktivität, die Öffnung am Transkriptionsstart hingegen hatte auf der langen Matrize beinahe keinen Effekt (Abb. 21). Die Aktivität mit den *B-reader helix* Mutanten erreichte bereits durch Voröffnung des stromaufwärts Bereiches Wildtyp-Niveau. Diese Stimulierung konnte an der langen Matrize nicht festgestellt werden (Abb. 22). Hier

reicht es möglicherweise nicht aus, die Blase vorzuöffnen, weil der Schmelzpunkt des Templates insgesamt höher ist.

Weiter stellte sich heraus, dass die Aktivität mit den *B-linker* Mutanten an den vorgeöffneten Templates partiell wiederhergestellt wurde, wobei die L92P Mutante stets die höchste Syntheserate aufwies. Auffallend war, dass sowohl *B-linker strand* als auch die *B-linker helix* Mutanten mehr abortive Aktivität auf einer im Startbereich als auf einer stromaufwärts gelegenen Blase stimulierten, während es sich mit Wildtyp TFB gegensätzlich verhält (Abb. 21, 23 und 24). Das Ergebnis jedenfalls deutet darauf hin, dass der *B-linker strand* eine von der Promotoröffnung unabhängige Funktion im bereits offenen Komplex besitzt.

Die *B-linker turn* Mutanten konnten sowohl durch TFE als auch durch Basenfehlpaarungen im Bereich des Promotors stimuliert werden (Abb. 19 und 23), vermutlich weil sie die Integrität von sowohl *B-reader* als auch *B-linker* beeinträchtigen. Auffällig war, dass die Alanin-Substitutionsmutante des *B-linker turns* weniger durch TFE stimulierbar ist als die entsprechende Deletionsmutante. Aufgrund von *Crosslinking*-Daten ist anzunehmen, dass TFB und TFE sich im PIC in räumlicher Nähe befinden (Bartlett et al., 2000; Grünberg et al., 2007). Eine direkte Interaktion des *B-linker turns* mit TFE müsste weiter beispielsweise über Protein-Protein-*Crosslinking* getestet werden.

4. Mechanismus der Initiation

Zusammenfassend implizieren die strukturellen und funktionellen Daten ein erweitertes Modell für den Initiationsmechanismus (Kostrewa et al., 2009)(Abb. 43). Die Bindung von TBP (TFIID) an die TATA-Box induziert eine Biegung in der DNA (Kim et al., 1993a; Kim et al., 1993b). Anschließend bindet TF(II)B über die *B-Core* Domäne an TBP und interagiert sequenzspezifisch mit dem BRE stromauf- und stromabwärts der TBP-gebundenen TATA-Box-DNA (Tsai und Sigler, 2000). Über die *Dock*-Domäne von TF(II)B wird die RNAP gebunden (Chen und Hahn, 2003; Bushnell et al., 2004). Alternativ dazu, kann der TF(II)B-RNAP Komplex an TBP-DNA binden (Grohmann et al., 2009). Möglicherweise spielt bei der Assoziation des Initiationskomplexes eine Konformationsänderung von TF(II)B eine Rolle (Deng und Roberts, 2007). Im geschlossenen Komplex ist der *B-ribbon* an *Dock* gebunden, der *B-reader* wird in die *Cleft* inseriert, der *B-linker* an *Rudder* und *Clamp Coiled-Coil* orientiert, der *B-Core* sitzt oberhalb von Wall an der Außenseite der RNAP, was sich unter anderem durch Faltung des ansonsten mobilen *Flap*-Loops äußert (Kostrewa et al., 2009). Die noch geschlossene DNA verläuft parallel zur *Cleft* (Chen und Hahn, 2004). Mit Hilfe des *B-linkers* und des *Clamp Coiled-Coils* (Kostrewa et al., 2009) wird die DNA in einem Abstand von etwa 20 bp zur TATA-Box aufgeschmolzen (Giardina und Lis, 1993). Der kodogene Strang wird in der DNA bindenden Spalte inseriert. In Hefe beginnt das *Scanning*, wobei die DNA prozessiv in stromabwärts Richtung nach einem geeigneten Startpunkt abgesucht wird (Giardina und Lis, 1993; Kuehner und Brow, 2006). Sobald im kodogenen Strang die *B-reader*

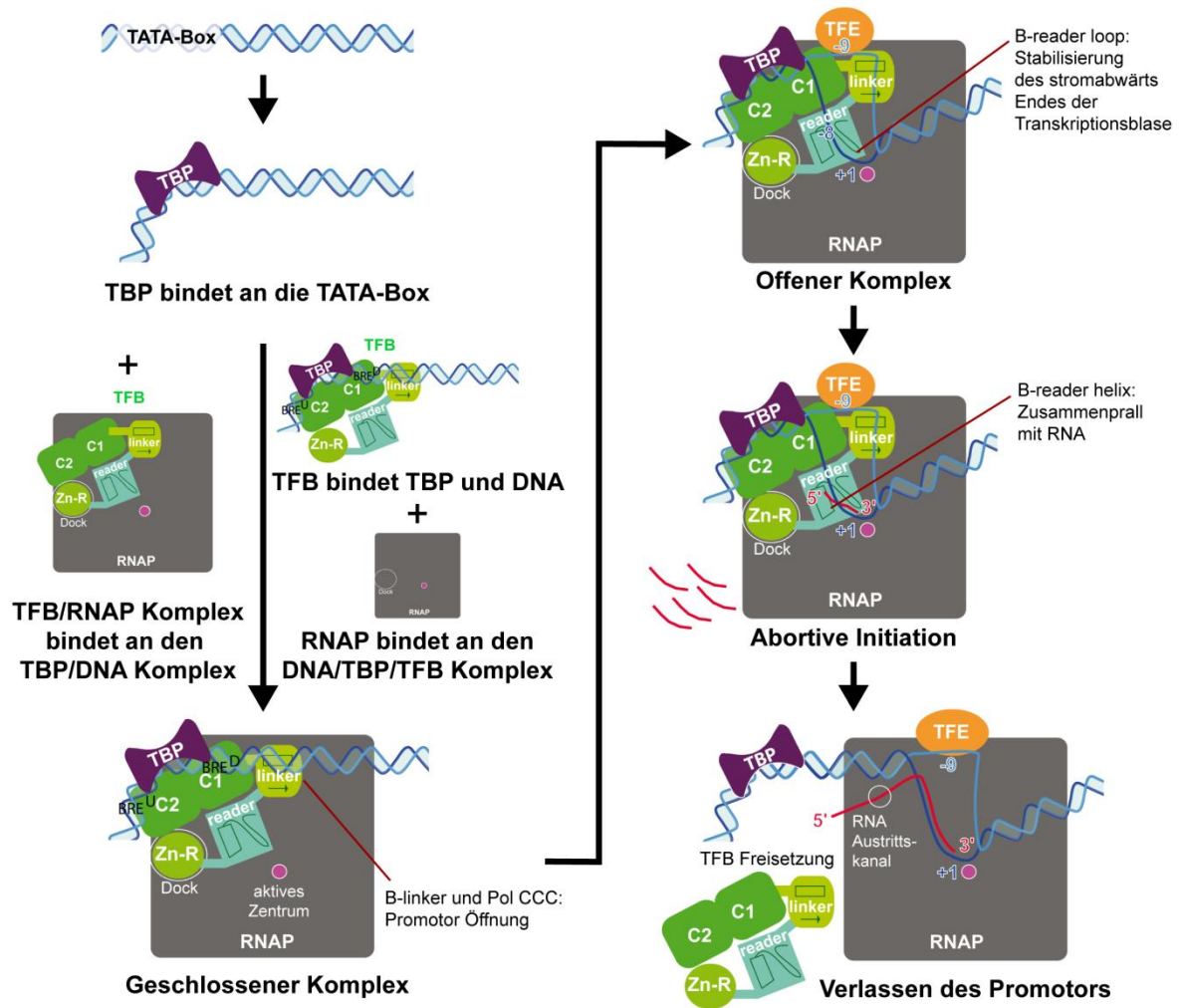


Abb. 43. Überblick über den Ablauf der Transkriptionsinitiation. Die strukturell-funktionellen Elemente von TF(II)B sind in verschiedenen Grüntönen, TBP ist violett, Template DNA dunkelblau, Non-Template DNA hellblau, RNA rot und die RNAP als graues Rechteck dargestellt. Details zum Ablauf siehe Text.

helix Reste 64-66 mit einem Thymin interagieren können und gleichzeitig in einem Abstand von 7-8 nt mit Hilfe der *B-reader loop* Aminosäuren um R78 eine Purin-Pyrimidin Sequenz (-1/+1) detektiert wird, kann die Initiation beginnen. Möglicherweise wirken TFIIF, Rpb9 und/oder Abschnitte der RNAP in *Protrusion* und *Lobe* negativ auf die Nutzung früher Startstellen, bzw. positiv auf die Fortsetzung des *Scannings* (Hull et al., 1995; Sun et al., 1996; Chen und Hahn, 2003; Ziegler et al., 2003; Chen und Hampsey, 2004; Ghazy et al., 2004; Freire-Picos et al., 2005; Chen et al., 2007; Chen et al., 2010). In Archaeen scheinen die Reste um R57 wichtig zu sein um den Template-Strang am aktiven Zentrum zu fixieren, während die RNAP mit dem Purin und Pyrimidin an Positionen -1 und +1 wechselwirkt um den Initiationstartpunkt festzulegen. Möglicher Weise spielen dabei weitere sequenzspezifische Interaktionen zwischen *B-reader* und der DNA zwischen Position -11 bis -2, dem PPE, eine Rolle. Im offenen Komplex stabilisiert der *B-linker* durch die Ausbildung eines β -Faltblattes mit *Rudder* zusätzlich das stromabwärts gelegene Ende der Transkriptionsblase. Ein Vergleich von EC-Pol II Strukturen mit der Pol II-TFIIB-Struktur zeigt darüber hinaus, dass

ab einer RNA-Länge von etwa 8 nt das 5'-Ende der RNA mit der *B-reader helix* zusammenstößt (Armache et al., 2005). Der *B-reader* muss spätestens bei dieser Länge aus der *Cleft* verdrängt werden. Ab einer Länge von etwa 26 nt wird der *B-ribbon* vom 5'-Ende der RNA durch Wechselwirkung mit der *Dock* Domäne verdrängt (Andrecka et al., 2008). Hier pausiert die eukaryotische RNAP (*Promotor Proximal Pausing*), bevor sie in die produktive Phase übergeht.

5. Vergleich von TF(II)B mit dem bakteriellen σ -Faktor

Wie TF(II)B kann auch Sigma(σ)-Faktor mit der bakteriellen *Core*-RNAP unabhängig von der Promotor-DNA assoziieren (Vassilyev et al., 2002; Murakami et al., 2003). Eine weitere Parallele ist, dass beim Übergang von Initiation zu Elongation schrittweise einzelne σ -Subdomänen aus der *Core*-RNAP verdrängt werden (Murakami und Darst, 2003). Im Gegensatz zu TF(II)B bleibt Sigma jedoch stochastisch in Elongationskomplexen erhalten, und erinnert in dieser Hinsicht mehr an archaeeles TFE (Bar-Nahum und Nudler, 2001; Grünberg et al., 2007).

Haushalts-Sigma-Faktoren (z.B. σ^{70} in *E. coli*) bestehen aus vier unabhängigen Subdomänen (σ_1 , σ_2 , σ_3 und σ_4) die durch flexible Linker miteinander verbunden sind. Zwei davon können variabler Länge sein ($\sigma_{1.1-2}$ - und σ_{3-4} -Linker mit der konservierte Region $\sigma_{3.2}$) (Murakami et al., 2002a; Murakami et al., 2002b; Vassilyev et al., 2002).

σ_1 befindet sich nahe des stromabwärts Endes des DNA-Kanals, und geht verloren beim Übergang vom geschlossenen zum offenen Komplex (Mekler et al., 2002). Im archaeeellen/eukaryotischen TF(II)B gibt es zu dieser Domäne keine Entsprechung.

σ_2 kontaktiert die β' *Clamp Coiled-Coil* Struktur und stellt damit das Pendant zum *B-linker* dar (Abb. 44). Das *Coiled-Coil* und Region σ_2 vermitteln die Promotoröffnung und Non-Template-Strang Bindung (Young et al., 2001). Die Interaktion wurde zunächst über Far-Western Blotting und Deletionsanalysen charakterisiert (Arthur und Burgess, 1998; Arthur et al., 2000). Besonders bemerkenswert ist, dass ein Fragment des σ -Faktors, welches σ_2 einschließt, zusammen mit einem etwa der *Clamp* entsprechendem β' -Fragment der bakteriellen RNAP den Promotor spezifisch öffnen kann (Young et al., 2004). Der sich direkt unter dem *Coiled-Coil* befindliche *Rudder* ist außerdem sowohl in Bakterien als auch Archaeen für die vollständige Promotoröffnung essentiell (Kuznedelov et al., 2002; Naji et al., 2008). σ_2 interagiert außerdem mit dem -10 Element bakterieller Promotoren (Marr und Roberts, 1997), bleibt auch in Elongationskomplexen gebunden und kann durch Interaktionen mit Sequenzen die dem -10 Element ähneln ein Pausieren der Elongation bedingen (Mooney et al., 2005). Das archaeele PPE entspricht topologisch dem -10 Element,

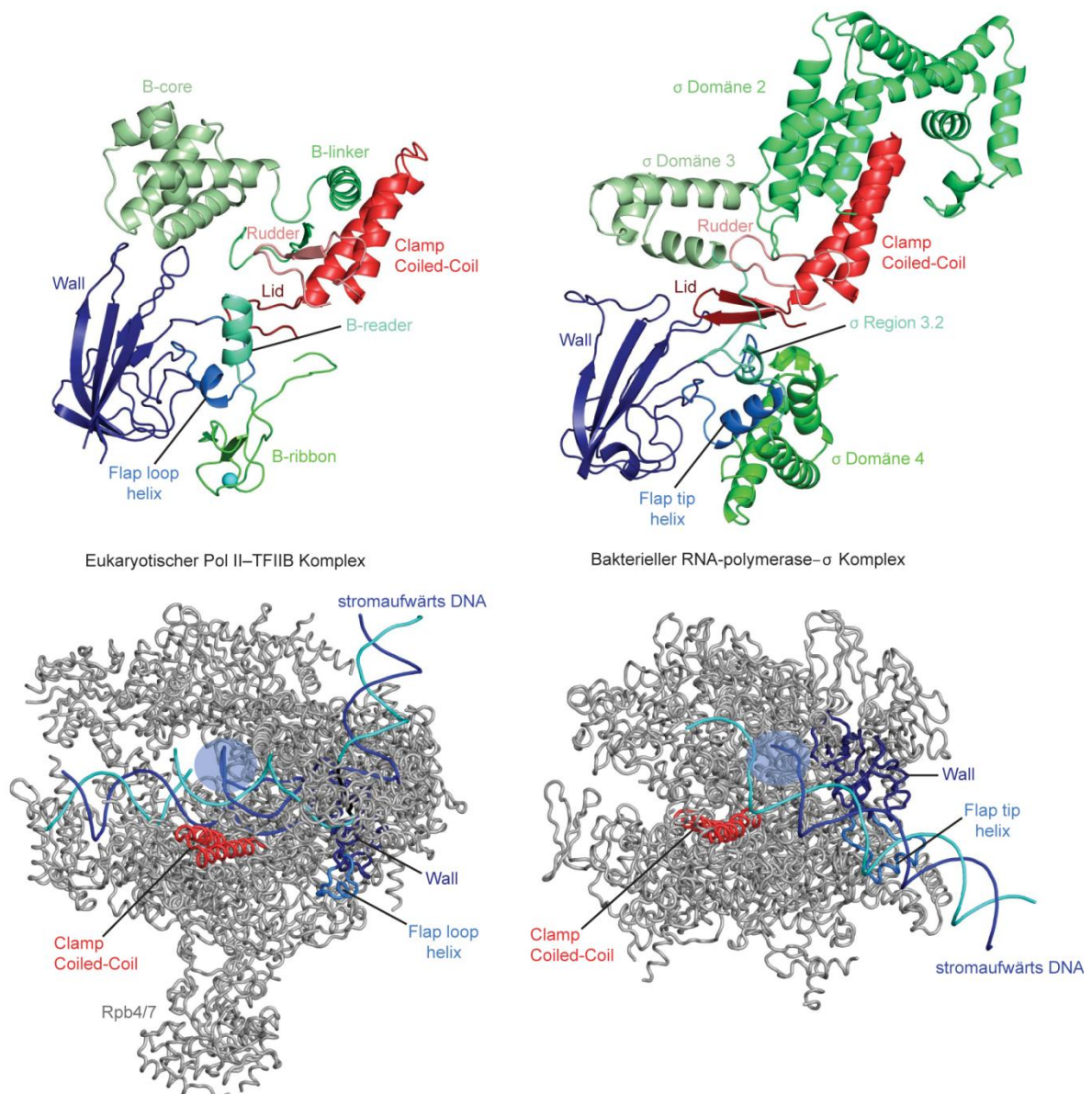


Abb. 44. Vergleich zwischen dem eukaryotischen und bakteriellen Initiationskomplex. Domänen die bei der Initiation eine Schlüsselrolle spielen sind oben in der eukaryotischen Pol II mit TFIIB (links) und der bakteriellen RNAP mit σ (rechts) dargestellt. Einander entsprechende TFIIB- und σ -Domänen sind in denselben Grüntönen gezeigt. Unten ist ein Vergleich der eukaryotischen und bakteriellen Initiationskomplexe in der Aufsicht gezeigt. Die RNAP ist grau, der Template-DNA-Strang dunkelblau, der Non-Template DNA Strang cyan, die Rpb1/b' *Clamp Coiled-Coil* Struktur rot dargestellt. Der Bereich in dem das DNA-Aufschmelzen stattfindet ist durch einen transparent blau gefüllten Kreis angedeutet.

auch wenn eine sequenzspezifische Interaktion mit entweder der *B-reader helix* oder etwa dem *B-linker* bisher nicht gezeigt wurde.

Der σ_{2-3} -Linker und σ_3 sind nahe an β' -*Zipper*, β -*Protrusion* und β -*Flap*. Damit entspricht σ_3 topologisch dem *B-core*, vor allem der N-terminalen *Cyclin*-Domäne (Abb. 44). Die σ_3 -RNAP Interaktion bleibt in ECs ebenfalls erhalten. Der σ_{3-4} -Linker entspricht dem *B-reader*, da er über den RNA-Exit Tunnel in die Cleft in Richtung aktives Zentrum ragt. Beim Übergang von Initiation zu Elongation wird er verdrängt (Mooney et al., 2005; Kostrewa et al., 2009).

σ_4 bindet die β' -Dock Domäne und entspricht damit funktional dem *B-ribbon* (Sharp et al., 1999). Chronologisch wird die σ_4 -Domäne im Anschluss an den σ_{3-4} -Linker durch das wachsende RNA-Polymer verdrängt und stellt daher eine weitere Analogie zu *B-ribbon* dar. Darüber hinaus interagiert σ_4 mit dem -35 Element, wobei die sequenzspezifischen Kontakte über ein HTH-Motiv hergestellt werden (Campbell et al., 2002). In TFIIB kontaktiert die C-terminalen *B-Core Cyclin* Domäne über ein HTH-Motiv (archaelles, humanes und Drosophila TF(II)B) das BRE^U-Element, welches sich ebenfalls ca. 30-35 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes befindet (Mooney et al., 2005). BRE^U und das -35-Element weisen jedoch keine Sequenzhomologie auf.

In Bakterien und eukaryotisch/archaelles RNAPs haben sich über den σ -Faktor und TF(II)B offenbar konvergent zwei verblüffend ähnliche Strategien zur RNAP-Interaktion, Promotorerkennung, Promotoröffnung und Transkriptionsinitiation entwickelt (Kostrewa et al., 2009).

B) Analyse von *Backtracking*

Ergänzend zu früheren Ergebnissen wurden in diesem Teil der Arbeit weitere Beweise dafür gesammelt, dass bei an Position 20 gestellten Elongationskomplexen auf dem *gdhC20*-Template (EC20) kein *Backtracking* auftritt. Diese Versuche bestätigten die überraschenden Befunde, dass die DNA-Protein-*Crosslinks* (durchgeführt von Sebastian Grünberg) von H in der Nähe des aktiven Zentrums von EC20 durch beträchtliche Umlagerung dieser Untereinheit, von der *Jaw*-Region an der Außenseite der RNAP in die DNA-bindende Spalte des Enzyms, verursacht werden (Grünberg et al., 2010).

Zunächst wurde der Nachweis erbracht, dass der photoaktivierbare APB-*Crosslinker* keinen arretierenden Einfluss auf den EC20 hat (Abb. 36). Die Funktion von TFS bleibt ebenfalls unbeeinträchtigt. Alle weiteren Versuche wurden in Gegenwart und Abwesenheit von Nukleotiden auf immobilisierten *gdhC20*-Matrizen ohne *Crosslinker* durchgeführt.

Eine Kinetik der TFS-induzierten Spaltung sollte ein möglicherweise längeres *Backtracking* durch die Bildung langer RNA-Fragmente nachweisen. Die erste Spaltung erfolgte jedoch stets zwischen dem 17. und 18. Nukleotid, längere Spaltprodukte wurden nicht erzeugt (Abb. 37). Geringe Mengen an 19 nt langen RNA-Fragmenten stammen wahrscheinlich von intrinsischer RNA-Spaltungsaktivität der RNAP (Hausner et al., 2000). Das Ergebnis deutet bereits an, dass *Backtracking* um maximal ein Nukleotid oder im Falle des Falscheinbaus um zwei Nukleotide auftritt. Die in den Versuchen getesteten Inkubationszeiten der EC20 Komplexe waren sowohl kürzer als auch länger als in den *Crosslinking* Versuchen. Da die resultierenden zeitabhängigen Spaltungsmuster identisch waren, kann angenommen werden, dass der EC20 äußerst stabil ist und zwar unabhängig davon ob er mit oder ohne Nukleotide inkubiert wird. Dies geht einher mit rezenten Strukturdaten, die zeigen, dass *Backtracking* um ein bis zwei Nukleotide eine stabile Konformation für Elongationskomplexe darstellt (Sydow et al., 2009; Wang et al., 2009). TFIIS induzierte Spaltung ergab in diesen Pol II Komplexen ebenfalls ein Dinukleotid. Im Gegensatz zu eukaryotischem TFIIS (Wang et al., 2009) scheint archaeelles TFS jedenfalls keine Präferenz für gestellte Komplexe mit einem Falscheinbau am terminalen Nukleotid zu besitzen (Abb. 37). Letztlich beweist der Eisenspaltungs-Versuch nach Nudler an EC20 (Nudler et al., 1997), dass *Backtracking* um maximal 1-2 Nukleotide erfolgt sein kann.

Unabhängig davon belegt die Spaltungskinetik in Gegenwart von TFS und ATP, welches an Position -2 eingebaut werden soll, dass nach erfolgter Elongation stets zunächst ein Dinukleotid gespalten wird (Abb. 38). Dies lässt vermuten, dass das aktive Zentrum der RNAP nach jedem Elongationsschritt eine Konformation einnimmt, die erst von TFS modifiziert werden muss, um Spaltung zu ermöglichen. Versuche mit verschiedenen langen 3'-Überhängen im *S. cerevisiae* System haben gezeigt, dass die Länge der TFIIS induzierten Pol II Spaltprodukte stets $n+1$ ist, wenn n die Anzahl der 3' fehlgepaarten Basen ist (Wang et al., 2009). Das aktive Zentrum muss also zwischen Register -1 und -2 gebracht werden. Strukturdaten mit inaktivem TFS oder nicht-hydrolysierbaren RNA-Analoga zeigen einige der Umformungen die TFS vornimmt. Der *Trigger Loop* bei *Backtracking* um 1-2 Positionen

liegt in der *wedged* Position vor, während die Bindung von TFIIS zur Öffnung des *Trigger Loops* führt. Ebenso wird die Position der RNA bzw. des DNA-RNA-Hybrides aufgrund der TFIIS-Bindung verändert. Die Position der Nukleinsäuren in ECs mit TFIIS ähneln dem Posttranslokationstadium, die Insertionsstelle wäre ohne TFIIS frei zugänglich (Wang et al., 2009).

Ist die entsprechende Umformung des aktiven Zentrums in der archaeellen RNAP vorgenommen und findet nach der ersten Spaltung kein Elongationsschritt statt, werden offenbar hintereinander gelegene Phosphodiesterbindungen konsekutiv gespalten (Abb. 37 und 38). Das aktive Zentrum befindet sich solange im „Spaltungsmodus“, bis wieder ein NTP eingebaut werden kann. Möglicherweise reicht bereits die Bindung eines NTPs in der Präinsertionsstelle, welche mit dem β -*hairpin loop* von TF(II)S überlappt, um den Spaltungsfaktor zu verdrängen und die RNAP in den „Elongationsmodus“ zurückzuführen.

Intrinsische RNA-Spaltungsaktivität der *P. furiosus* RNAP wurde bei Verwendung anderer radioaktiver Markierungen als [α - 32 P]-UTP detektiert (Abb. 39). Insbesondere bei der Markierung mit [α - 32 P]-ATP kann man davon ausgehen, dass an Position -2 (in EC20 an Position 19) eine statistisch erhöhte Wahrscheinlichkeit für den Fehleinbau gegeben ist. Demgemäß werden 18 nt lange Spaltprodukten gebildet. Strukturdaten von entsprechenden ECs mit einer Basenfehlpaarungen an Position -2 zeigen, dass das terminale Nukleotid (Position -1) eine sogenannte *Fray Site* einnimmt (Sydow et al., 2009). Bei Markierung mit [α - 32 P]-GTP (in EC20 an Position 20) werden vor allem 19nt lange RNAs gebildet, und zu einem geringen Ausmaß auch 17 (Position 18) und 16 nt (Position 17) lange RNAs (Abb. 39). Im Gegensatz zur TFS induzierten Spaltung, muss durch die intrinsische Spaltungsaktivität die Spaltung von Basenfehlpaarungen schneller stattfinden als die von korrekten Basenpaarungen. Die Daten implizieren, dass die RNAP auf einen Falscheinbau reagiert und in der Lage ist diesen spezifisch zu entfernen, zumindest in Abwesenheit von NTPs.

An assemblierten Elongationskomplexen (Kireeva et al., 2000) konnte ein einzelner Fehleinbau effizient überlesen werden, fünf Fehlpaarungen hingegen nicht (Abb. 41). Die TFS-induzierte Spaltung war mit einem fehlgepaarten Nukleotid am 3'-Ende möglich, bei einem 5 nt langem 3'-Überhang nicht. Eine Erklärung wäre, dass die Spaltung von 5 Nukleotiden mit archaeellem TFS generell nicht möglich ist. Dies würde weiter bedeuten, dass *Backtracking* der RNAP von *P. furiosus* um 5 nt möglicher Weise nicht auftritt. Aufgrund von spezifischen Wechselwirkungen, die die RNAP mit der vom aktiven Zentrum gelösten RNA eingehen kann (Wang et al., 2009) ist auch denkbar, dass die Sequenz des 3'-Überhangs die Spaltung nicht erlaubt. Außerdem ist zu beachten, dass die RNAP im Vergleich zu keinem oder einem 3'-Überhang schlecht an dieses *Scaffold* gebunden hat (Abb. 41). Es ist nicht eindeutig, ob es überhaupt zur korrekten Ausbildung des beabsichtigten Komplexes gekommen ist, insbesondere da auch kaum intrinsische Spaltungsaktivität nachweisbar war. Entsprechend der neuen Strukturdaten von (Wang et al., 2009) sollte versucht werden, die Spaltungseffizienz von Überhängen die gleich oder länger als 7 nt sind zu überprüfen, da anzunehmen ist, dass auch in archaeellen ECs zusätzliche Kontakte zur 3' RNA das *Backtracking* stabilisiert. Außerdem sollten Spaltungen mit 2, 3 und 4 nt langen

Überhängen getestet werden. Grundsätzlich handelt es sich um eine sehr artifizielle Situation, da die Wahrscheinlichkeit von mehr als zwei aufeinanderfolgenden Fehleinbauten *in vivo* quasi null ist. Daher wäre es für weitere Untersuchungen von *Backtracking* im *P. furiosus* System wünschenswert, eine Matrize zu finden auf der *Backtracking* natürlicher Weise auftritt. Die Daten belegen einen ersten Versuch, assemblierte *Elongationscaffolds* zur Analyse von TFS-induzierter Spaltung der *P. furiosus* RNAP heranzuziehen und ermöglichen in Zukunft fortführende Versuche in diese Richtung.

VI) Zusammenfassung

Die Transkriptionsmaschinerie von Archaeen ist am nächsten verwandt mit, und eine vereinfachte Version der RNA-Polymerase II (Pol II) Maschinerie von Eukaryoten. Bei der Initiation der Transkription nimmt der hochkonservierte Transkriptionsfaktor (II)B sowohl in Archaeen (TFB) als auch in Eukaryoten (TFIIB) eine zentrale Rolle ein. In dieser Arbeit wird ein neues Modell für den Ablauf der Transkriptionsinitiation präsentiert, welches die Ergebnisse i) einer Pol II-TFIIB Strukturanalyse von *S. cerevisiae* (Labor Patrick Cramer, Genzentrum, LMU München), ii) einer Funktionsanalyse komplementärer Mutationen in TFB und rekonstituierter RNA-Polymerase (RNAP) von *P. furiosus* und iii) einer *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von Hefe TFIIB Mutanten integriert.

Die bereits bekannten N- und C-terminalen Domänen von TF(II)B, *B-ribbon* (Zink-Ribbon) und *B-Core*, werden von zwei erstmals beschriebenen strukturellen Elementen namens *B-reader* und *B-linker* verbunden. Im Komplex mit Pol II, formt der *B-reader* von TFIIB nicht wie bislang angenommen nur eine Schleife („*B-Finger*“), sondern anfangs eine α -Helix gefolgt von einem mobilen Loop in der DNA-bindenden Spalte (*Cleft*) der RNAP. Ebenfalls in der *Cleft* befindet sich der *B-linker*, welcher ein β -Faltblatt mit der als *Rudder* bezeichneten Schleife in der *Cleft* bildet und sich als α -Helix parallel zur *Cleft*, senkrecht entlang eines *Coiled-Coils* (a8 und a9 in RNAP Untereinheit Rpb1/ A') an der *Cleft* Innenseite fortsetzt.

Im Anschluss an die Bindung der RNAP durch TF(II)B an den Promotor wird durch die RNAP die DNA im Bereich des Transkriptionsstarts aufgeschmolzen (Bildung des offenen Komplexes). Über KMnO₄-Footprints und Transkriptionsversuche an Heteroduplex-Matrizen wird im *P. furiosus* System nachgewiesen, dass sowohl der *B-linker* von TFB als auch die *Coiled-Coil* Struktur der RNAP für die Bildung des offenen Komplexes essentiell sind. Die Integrität der *B-linker helix* scheint entscheidend zu sein, da eine Prolin Substitution einer konservierten Aminosäure (L92) in dieser α -Helix die Promotoröffnung verhindert, die Verwendung von Heteroduplex-Matrizen jedoch die Transkriptionsaktivität wiederherstellt.

Im offenen Komplex ist der kodogene DNA-Strang in der DNA-bindenden Spalte der RNAP gebunden. *In vitro* Transkriptions- und KMnO₄-Footprintinganalysen belegen, dass der *B-reader* von TFB für die effiziente Initiation unerlässlich ist, da er die Öffnung der Transkriptionsblase bis hin zum stromabwärts Ende einschließlich des Transkriptionsstarts ermöglicht. Die hier durchgeführte detaillierte Mutationsanalyse von TF(II)B erlaubt es, die Funktion im Stabilisieren des stromabwärts Endes der Transkriptionsblase einem konservierten Arginin (*P. furiosus* R57, *S. cerevisiae* R78) an der vermuteten Spitze des mobilen *B-reader loops* zuzuschreiben, welche wahrscheinlich mit dem Transkriptionsstart interagiert. Die *B-reader helix* hingegen vermittelt über Seitenketten, die in Richtung des transkribierten DNA Stranges orientiert sind, die Erkennung eines konservierten Thymins sieben bis acht Basen stromaufwärts des Hefe Transkriptionsstarts.

Außerdem werden Untersuchungen zum *Backtracking*-Status von gestellten Elongationskomplexen von *P. furiosus* gezeigt. Diese erlauben die eindeutige Interpretation

der DNA-Protein-*Crosslinking* Ergebnisse von Sebastian Grünberg, welche eine Umlagerung der Untereinheit H beim Übergang von Initiation zu Elongation implizieren. Die Analyse eines Elongationskomplexes durch TFS-induzierte RNA-Spaltung sowie Kartierung des RNA-3'-Endes relativ zum aktiven Zentrum der RNAP durch Fe^{2+} -Spaltung schließen *Backtracking* in den für die *Crosslinking* Versuche verwendeten Elongationskomplexen aus. Die beobachteten *Crosslinks* von H nahe des aktiven Zentrums sind demnach nicht auf eine Rückwärtsbewegung der RNAP, sondern tatsächlich auf eine Transkriptionszyklus-abhängige Umlagerung dieser Untereinheit zurückzuführen.

VII) Summary

The archaeal transcription machinery is most related to, and a simplified version of the RNA polymerase II (Pol II) transcription machinery in eukaryotes. During initiation of transcription, the highly conserved transcription factor (II)B plays a central role in archaea (TFB) and eukaryotes (TFIIB). This work presents a novel model for the mechanism of transcription initiation, integrating i) a novel Pol II-TFIIB crystal structure of *S. cerevisiae* (Group of Patrick Cramer, Gene Center, LMU Munich), ii) a functional analysis of complementary mutations in TFB and reconstituted RNA polymerase (RNAP) of *P. furiosus* and iii) an *in vitro* and *in vivo* characterization of yeast TFIIB mutants.

Two novel structural elements in TFIIB, the B-reader and B-linker, connect the previously identified N-terminal B-ribbon (Zinc-ribbon) structure with the C-terminal B-core domain. In the pol II-TFIIB structure, the B-reader does not form a single loop ("B-finger"), but instead consists of an α -helix followed by a mobile loop in the DNA binding cleft of the RNAP. The B-linker is positioned in the cleft as well, where it forms a β -sheet with cleft loop rudder and an α -helix that runs in parallel to the cleft and perpendicular to a coiled coil structure ($\alpha 8$ and $\alpha 9$ in RNAP subunits Rpb1/A') at the inner surface of the cleft.

Upon RNAP recruitment to the promoter with the aid of TF(II)B, the RNAP melts the DNA around the transcription start site (open complex formation). KMnO₄ footprinting and transcription assays on heteroduplex templates in the *P. furiosus* system show, that both the B-linker element of TFB and the coiled-coil structure of the RNAP are essential for open complex formation. The integrity of the B-linker helix seems to be necessary for open complex formation, as substitution of a conserved residue (L92) by proline within this α -helix completely abolishes promoter opening, while transcription activity with this mutant is restored using a heteroduplex template.

In the open complex, the coding DNA strand is bound within the DNA binding cleft of the RNAP. *In vitro* transcription tests and KMnO₄ footprints reveal that the B-reader is responsible for efficient initiation because it promotes DNA-melting until the downstream end of the transcription bubble including the transcription start site. The detailed mutational analysis shown here allows specifying the residue in charge of stabilizing the downstream end of the transcription bubble (*P. furiosus* R57, *S. cerevisiae* R78). Presumably this is due to interaction of the putative tip of the B-reader loop with the transcription start site. In contrast, residues of the B-reader helix pointing towards the template DNA strand in the cleft mediate recognition of a thymine eight or seven nucleotides upstream of the transcription start site conserved in yeast promoters.

Furthermore, the backtracking state of stalled elongation complexes of *P. furiosus* was investigated. The data shown here allow the unambiguous interpretation of DNA-protein crosslinking results obtained by Sebastian Grünberg, which suggest a repositioning of subunit H during the transition from initiation to elongation. TFS induced RNA cleavage and mapping of the 3' RNA end relative to the active site using Fe²⁺-cleavage confirms that

backtracking does not occur in elongation complexes used for the crosslinking experiments. This indicates, that crosslinking of RNAP subunit H nearby the active site in elongation complexes is not due to retrograde movement of the RNAP but indeed occurs because of transcription cycle dependent repositioning of this subunit.

VIII) Literaturverzeichnis

- Alic, N., Ayoub, N., Landrieux, E., Favry, E., Baudouin-Cornu, P., Riva, M., und Carles, C. (2007). Selectivity and proofreading both contribute significantly to the fidelity of RNA polymerase III transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10400-10405.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Andrecka, J., Lewis, R., Bruckner, F., Lehmann, E., Cramer, P., und Michaelis, J. (2008). Single-molecule tracking of mRNA exiting from RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 135-140.
- Andrecka, J., Treutlein, B., Arcusa, M. A., Muschielok, A., Lewis, R., Cheung, A. C., Cramer, P., und Michaelis, J. (2009). Nano positioning system reveals the course of upstream and nontemplate DNA within the RNA polymerase II elongation complex. *Nucleic Acids Res* 37, 5803-5809.
- Armache, K. J., Kettenberger, H., und Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6964-6968.
- Armache, K. J., Mitterweger, S., Meinhart, A., und Cramer, P. (2005). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem* 280, 7131-7134.
- Arthur, T. M., Anthony, L. C., und Burgess, R. R. (2000). Mutational analysis of beta '260-309, a sigma 70 binding site located on Escherichia coli core RNA polymerase. *J Biol Chem* 275, 23113-23119.
- Arthur, T. M., und Burgess, R. R. (1998). Localization of a sigma70 binding site on the N terminus of the Escherichia coli RNA polymerase beta' subunit. *J Biol Chem* 273, 31381-31387.
- Artsimovitch, I., und Landick, R. (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7090-7095.
- Bagby, S., Kim, S., Maldonado, E., Tong, K. I., Reinberg, D., und Ikura, M. (1995). Solution structure of the C-terminal core domain of human TFIIB: similarity to cyclin A and interaction with TATA-binding protein. *Cell* 82, 857-867.
- Bangur, C. S., Pardee, T. S., und Ponticelli, A. S. (1997). Mutational analysis of the D1/E1 core helices and the conserved N-terminal region of yeast transcription factor IIB (TFIIB): identification of an N-terminal mutant that stabilizes TATA-binding protein-TFIIB-DNA complexes. *Mol Cell Biol* 17, 6784-6793.

- Bar-Nahum, G., Epshtein, V., Ruckenstein, A. E., Rafikov, R., Mustaev, A., und Nudler, E. (2005). A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. *Cell* 120, 183-193.
- Bar-Nahum, G., und Nudler, E. (2001). Isolation and characterization of sigma(70)-retaining transcription elongation complexes from *Escherichia coli*. *Cell* 106, 443-451.
- Bartlett, M. S. (2005). Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase. *Curr Opin Microbiol* 8, 677-684.
- Bartlett, M. S., Thomm, M., und Geiduschek, E. P. (2000). The orientation of DNA in an archaeal transcription initiation complex. *Nat Struct Biol* 7, 782-785.
- Bartlett, M. S., Thomm, M., und Geiduschek, E. P. (2004). Topography of the euryarchaeal transcription initiation complex. *J Biol Chem* 279, 5894-5903.
- Bell, S. D., Brinkman, A. B., van der Oost, J., und Jackson, S. P. (2001). The archaeal TFIIIEalpha homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO Rep* 2, 133-138.
- Bell, S. D., und Jackson, S. P. (1998). Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol* 6, 222-228.
- Bell, S. D., und Jackson, S. P. (2000). The role of transcription factor B in transcription initiation and promoter clearance in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol Chem* 275, 12934-12940.
- Bell, S. D., Kosa, P. L., Sigler, P. B., und Jackson, S. P. (1999). Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13662-13667.
- Belogurov, G. A., Vassilyeva, M. N., Svetlov, V., Klyuyev, S., Grishin, N. V., Vassilyev, D. G., und Artsimovitch, I. (2007). Structural basis for converting a general transcription factor into an operon-specific virulence regulator. *Mol Cell* 26, 117-129.
- Blank, A., Gallant, J. A., Burgess, R. R., und Loeb, L. A. (1986). An RNA polymerase mutant with reduced accuracy of chain elongation. *Biochemistry* 25, 5920-5928.
- Brennan, R. G. (1993). The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell* 74, 773-776.
- Brueckner, F., Armache, K. J., Cheung, A., Damsma, G. E., Kettenberger, H., Lehmann, E., Sydow, J., und Cramer, P. (2009). Structure-function studies of the RNA polymerase II elongation complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65, 112-120.
- Brueckner, F., und Cramer, P. (2008). Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation. *Nat Struct Mol Biol* 15, 811-818.

- Brueckner, F., Hennecke, U., Carell, T., und Cramer, P. (2007). CPD damage recognition by transcribing RNA polymerase II. *Science* 315, 859-862.
- Buratowski, S., und Zhou, H. (1993). Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5633-5637.
- Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6969-6973.
- Bushnell, D. A., Westover, K. D., Davis, R. E., und Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Ångströms. *Science* 303, 983-988.
- Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M. L., und Darst, S. A. (2002). Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* 9, 527-539.
- Campbell, E. A., Westblade, L. F., und Darst, S. A. (2008). Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 11, 121-127.
- Carter, R., und Drouin, G. (2010). The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA polymerase III relative to RNA polymerase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors. *Mol Biol Evol* 27, 1035-43.
- Chedin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A., und Carles, C. (1998). The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes Dev* 12, 3857-3871.
- Chen, B. S., und Hampsey, M. (2004). Functional interaction between TFIIB and the Rpb2 subunit of RNA polymerase II: implications for the mechanism of transcription initiation. *Mol Cell Biol* 24, 3983-3991.
- Chen, H. T., und Hahn, S. (2003). Binding of TFIIB to RNA polymerase II: Mapping the binding site for the TFIIB zinc ribbon domain within the preinitiation complex. *Mol Cell* 12, 437-447.
- Chen, H. T., und Hahn, S. (2004). Mapping the location of TFIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. *Cell* 119, 169-180.
- Chen, H. T., Legault, P., Glushka, J., Omichinski, J. G., und Scott, R. A. (2000). Structure of a (Cys3His) zinc ribbon, a ubiquitous motif in archaeal and eucaryal transcription. *Protein Sci* 9, 1743-1752.

- Chen, H. T., Warfield, L., und Hahn, S. (2007). The positions of TFIIF and TFIIE in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Nat Struct Mol Biol* 14, 696-703.
- Chen, Z. A., Jawhari, A., Fischer, L., Buchen, C., Tahir, S., Kamenski, T., Rasmussen, M., Lariviere, L., Bukowski-Wills, J. C., Nilges, M., *et al.* (2010). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *Embo J* 29, 717-726.
- Cho, E. J., und Buratowski, S. (1999). Evidence that transcription factor IIB is required for a post-assembly step in transcription initiation. *J Biol Chem* 274, 25807-25813.
- Choder, M. (2004). Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci* 29, 674-681.
- Choder, M., und Young, R. A. (1993). A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress responses and stress survival. *Mol Cell Biol* 13, 6984-6991.
- Cox, J. M., Hayward, M. M., Sanchez, J. F., Gegnas, L. D., van der Zee, S., Dennis, J. H., Sigler, P. B., und Schepartz, A. (1997). Bidirectional binding of the TATA box binding protein to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13475-13480.
- Cramer, P. (2002). Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 12, 89-97.
- Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev* 14, 218-226.
- Cramer, P., Armache, K. J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G. E., Dengl, S., Geiger, S. R., Jasiak, A. J., *et al.* (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys* 37, 337-352.
- Cramer, P., und Arnold, E. (2009). Proteins: how RNA polymerases work. *Curr Opin Struct Biol* 19, 680-682.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., und Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288, 640-649.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292, 1863-1876.
- Creti, R., Londei, P., und Cammarano, P. (1993). Complete nucleotide sequence of an archaeal (*Pyrococcus woesei*) gene encoding a homolog of eukaryotic transcription factor IIB (TFIIB). *Nucleic Acids Res* 21, 2942.
- Damsma, G. E., Alt, A., Brueckner, F., Carell, T., und Cramer, P. (2007). Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1127-1133.

- Darst, S. A. (2001). Bacterial RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol* 11, 155-162.
- Darst, S. A., Opalka, N., Chacon, P., Polyakov, A., Richter, C., Zhang, G., und Wriggers, W. (2002). Conformational flexibility of bacterial RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4296-4301.
- de Mercoyrol, L., Corda, Y., Job, C., und Job, D. (1992). Accuracy of wheat-germ RNA polymerase II. General enzymatic properties and effect of template conformational transition from right-handed B-DNA to left-handed Z-DNA. *Eur J Biochem* 206, 49-58.
- DeLong, E. F. (1998). Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Curr Opin Genet Dev* 8, 649-654.
- Deng, W., und Roberts, S. G. (2007). TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Chromosoma* 116, 417-429.
- Donahue, B. A., Yin, S., Taylor, J. S., Reines, D., und Hanawalt, P. C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8502-8506.
- Doolittle, R. F., Feng, D. F., Tsang, S., Cho, G., und Little, E. (1996). Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* 271, 470-477.
- Durniak, K. J., Bailey, S., und Steitz, T. A. (2008). The structure of a transcribing T7 RNA polymerase in transition from initiation to elongation. *Science* 322, 553-557.
- Dvir, A., Conaway, J. W., und Conaway, R. C. (2001). Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* 11, 209-214.
- Ebright, R. H. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J Mol Biol* 304, 687-698.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-1797.
- Edwards, A. M., Kane, C. M., Young, R. A., und Kornberg, R. D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J Biol Chem* 266, 71-75.
- Eichner, J., Chen, H. T., Warfield, L., und Hahn, S. (2010). Position of the general transcription factor TFIIF within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Embo J* 29, 706-716.

- Facciotti, M. T., Reiss, D. J., Pan, M., Kaur, A., Vuthoori, M., Bonneau, R., Shannon, P., Srivastava, A., Donohoe, S. M., Hood, L. E., und Baliga, N. S. (2007). General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4630-4635.
- Faitar, S. L., Brodie, S. A., und Ponticelli, A. S. (2001). Promoter-specific shifts in transcription initiation conferred by yeast TFIIB mutations are determined by the sequence in the immediate vicinity of the start sites. *Mol Cell Biol* 21, 4427-4440.
- Fiala, G., und Stetter, K. O. (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archives of Microbiology* 145, 56-61.
- Fish, R. N., und Kane, C. M. (2002). Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors. *Biochim Biophys Acta* 1577, 287-307.
- Freire-Picos, M. A., Krishnamurthy, S., Sun, Z. W., und Hampsey, M. (2005). Evidence that the Tfg1/Tfg2 dimer interface of TFIIF lies near the active center of the RNA polymerase II initiation complex. *Nucleic Acids Res* 33, 5045-5052.
- Gajiwala, K. S., und Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10, 110-116.
- Gaspari, M., Larsson, N. G., und Gustafsson, C. M. (2004). The transcription machinery in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1659, 148-152.
- Geiduschek, E. P., und Ouhammouch, M. (2005). Archaeal transcription and its regulators. *Mol Microbiol* 56, 1397-1407.
- Ghavi-Helm, Y., Michaut, M., Acker, J., Aude, J. C., Thuriaux, P., Werner, M., und Soutourina, J. (2008). Genome-wide location analysis reveals a role of TFIIS in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 22, 1934-1947.
- Ghazy, M. A., Brodie, S. A., Ammerman, M. L., Ziegler, L. M., und Ponticelli, A. S. (2004). Amino acid substitutions in yeast TFIIF confer upstream shifts in transcription initiation and altered interaction with RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 24, 10975-10985.
- Ghosh, M., Elsby, L. M., Mal, T. K., Gooding, J. M., Roberts, S. G., und Ikura, M. (2004). Probing Zn²⁺-binding effects on the zinc-ribbon domain of human general transcription factor TFIIB. *Biochem J* 378, 317-324.
- Giardina, C., und Lis, J. T. (1993). DNA melting on yeast RNA polymerase II promoters. *Science* 261, 759-762.
- Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292, 1876-1882.

- Goede, B., Naji, S., von Kampen, O., Ilg, K., und Thomm, M. (2006). Protein-protein interactions in the archaeal transcriptional machinery: binding studies of isolated RNA polymerase subunits and transcription factors. *J Biol Chem* 281, 30581-30592.
- Goodchild, A., Saunders, N. F., Ertan, H., Raftery, M., Guilhaus, M., Curmi, P. M., und Cavicchioli, R. (2004). A proteomic determination of cold adaptation in the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *Mol Microbiol* 53, 309-321.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., und Metoz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305-308.
- Grohmann, D., Hirtreiter, A., und Werner, F. (2009a). Molecular mechanisms of archaeal RNA polymerase. *Biochem Soc Trans* 37, 12-17.
- Grohmann, D., Hirtreiter, A., und Werner, F. (2009b). RNAP subunits F/E (RPB4/7) are stably associated with archaeal RNA polymerase: using fluorescence anisotropy to monitor RNAP assembly in vitro. *Biochem J* 421, 339-343.
- Grünberg, S., Bartlett, M. S., Naji, S., und Thomm, M. (2007). Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. *J Biol Chem* 282, 35482-35490.
- Grünberg, S., Reich, C., Zeller, M. E., Bartlett, M. S., und Thomm, M. (2010). Rearrangement of the RNA polymerase subunit H and the lower jaw in archaeal elongation complexes. *Nucleic Acids Res* 38, 1950-1963.
- Guglielmi, B., Soutourina, J., Esnault, C., und Werner, M. (2007). TFIIS elongation factor and Mediator act in conjunction during transcription initiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16062-16067.
- Ha, I., Roberts, S., Maldonado, E., Sun, X., Kim, L. U., Green, M., und Reinberg, D. (1993). Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev* 7, 1021-1032.
- Hain, J., Reiter, W. D., Hudepohl, U., und Zillig, W. (1992). Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 20, 5423-5428.
- Hanzelka, B. L., Darcy, T. J., und Reeve, J. N. (2001). TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIIEalpha. *J Bacteriol* 183, 1813-1818.
- Hartung, S., und Hopfner, K. P. (2009). Lessons from structural and biochemical studies on the archaeal exosome. *Biochem Soc Trans* 37, 83-87.
- Hausner, W., Frey, G., und Thomm, M. (1991). Control regions of an archaeal gene. A TATA box and an initiator element promote cell-free transcription of the tRNA(Val) gene of *Methanococcus vannielii*. *J Mol Biol* 222, 495-508.

- Hausner, W., Lange, U., und Musfeldt, M. (2000). Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* 275, 12393-12399.
- Hausner, W., und Thomm, M. (2001). Events during initiation of archaeal transcription: open complex formation and DNA-protein interactions. *J Bacteriol* 183, 3025-3031.
- Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C., und Thomm, M. (1996). Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* 271, 30144-30148.
- Hekmatpanah, D. S., und Young, R. A. (1991). Mutations in a conserved region of RNA polymerase II influence the accuracy of mRNA start site selection. *Mol Cell Biol* 11, 5781-5791.
- Hethke, C., Geerling, A. C., Hausner, W., de Vos, W. M., und Thomm, M. (1996). A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* 24, 2369-2376.
- Hirata, A., Kanai, T., Santangelo, T. J., Tajiri, M., Manabe, K., Reeve, J. N., Imanaka, T., und Murakami, K. S. (2008a). Archaeal RNA polymerase subunits E and F are not required for transcription in vitro, but a *Thermococcus kodakarensis* mutant lacking subunit F is temperature-sensitive. *Mol Microbiol* 70, 623-633.
- Hirata, A., Klein, B. J., und Murakami, K. S. (2008b). The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature* 451, 851-854.
- Hirata, A., und Murakami, K. S. (2009). Archaeal RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol* 19, 724-731.
- Hirose, Y., und Ohkuma, Y. (2007). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J Biochem* 141, 601-608.
- Hirtreiter, A., Damsma, G. E., Cheung, A. C., Klose, D., Grohmann, D., Vojnic, E., Martin, A. C., Cramer, P., und Werner, F. (2010). Spt4/5 stimulates transcription elongation through the RNA polymerase clamp coiled-coil motif. *Nucleic Acids Res*. PMID: 20197319
- Hirtreiter, A., Grohmann, D., und Werner, F. (2009). Molecular mechanisms of RNA polymerase--the F/E (RPB4/7) complex is required for high processivity in vitro. *Nucleic Acids Res* 38, 585-596.
- Holstege, F. C., Tantin, D., Carey, M., van der Vliet, P. C., und Timmers, H. T. (1995). The requirement for the basal transcription factor IIE is determined by the helical stability of promoter DNA. *Embo J* 14, 810-819.

- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A., und Zillig, W. (1983). Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *Embo J* 2, 1291-1294.
- Hull, M. W., McKune, K., und Woychik, N. A. (1995). RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev* 9, 481-490.
- Jasiak, A. J., Armache, K. J., Martens, B., Jansen, R. P., und Cramer, P. (2006). Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol Cell* 23, 71-81.
- Jasiak, A. J., Hartmann, H., Karakasili, E., Kalocsay, M., Flatley, A., Kremmer, E., Strasser, K., Martin, D. E., Soding, J., und Cramer, P. (2008). Genome-associated RNA polymerase II includes the dissociable Rpb4/7 subcomplex. *J Biol Chem* 283, 26423-26427.
- Jeon, C., Yoon, H., und Agarwal, K. (1994). The transcription factor TFIIS zinc ribbon dipeptide Asp-Glu is critical for stimulation of elongation and RNA cleavage by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9106-9110.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292, 195-202.
- Kanamaru, K., und Tanaka, K. (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 2215-2223.
- Kapanidis, A. N., Margeat, E., Ho, S. O., Kortkhonjia, E., Weiss, S., und Ebright, R. H. (2006). Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism. *Science* 314, 1144-1147.
- Kaplan, C. D., Larsson, K. M., und Kornberg, R. D. (2008). The RNA polymerase II trigger loop functions in substrate selection and is directly targeted by alpha-amanitin. *Mol Cell* 30, 547-556.
- Kelman, Z., und White, M. F. (2005). Archaeal DNA replication and repair. *Curr Opin Microbiol* 8, 669-676.
- Kettenberger, H., Armache, K. J., und Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* 114, 347-357.
- Kettenberger, H., Armache, K. J., und Cramer, P. (2004). Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell* 16, 955-965.
- Khazak, V., Estojak, J., Cho, H., Majors, J., Sonoda, G., Testa, J. R., und Golemis, E. A. (1998). Analysis of the interaction of the novel RNA polymerase II (pol II) subunit hsRPB4 with its partner hsRPB7 and with pol II. *Mol Cell Biol* 18, 1935-1945.

- Kim, B., Nesvizhskii, A. I., Rani, P. G., Hahn, S., Aebersold, R., und Ranish, J. A. (2007). The transcription elongation factor TFIIS is a component of RNA polymerase II preinitiation complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16068-16073.
- Kim, J. L., Nikolov, D. B., und Burley, S. K. (1993a). Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 365, 520-527.
- Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S., und Sigler, P. B. (1993b). Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* 365, 512-520.
- Kireeva, M. L., Komissarova, N., Waugh, D. S., und Kashlev, M. (2000). The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *J Biol Chem* 275, 6530-6536.
- Koga, Y., und Morii, H. (2007). Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 97-120.
- Komissarova, N., und Kashlev, M. (1997). Transcriptional arrest: Escherichia coli RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1755-1760.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., und Elkins, J. G. (2007). Orthologs of the small RPB8 subunit of the eukaryotic RNA polymerases are conserved in hyperthermophilic Crenarchaeota and "Korarchaeota". *Biol Direct* 2, 38.
- Korkhin, Y., Unligil, U. M., Littlefield, O., Nelson, P. J., Stuart, D. I., Sigler, P. B., Bell, S. D., und Abrescia, N. G. (2009). Evolution of Complex RNA Polymerases: The Complete Archaeal RNA Polymerase Structure. *PLoS Biol* 7, e102.
- Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., und Darst, S. A. (2000). A structural model of transcription elongation. *Science* 289, 619-625.
- Kosa, P. F., Ghosh, G., DeDecker, B. S., und Sigler, P. B. (1997). The 2.1-Å crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6042-6047.
- Kostrewa, D., Zeller, M. E., Armache, K. J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., und Cramer, P. (2009). RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* 462, 323-330.
- Koyama, H., Ito, T., Nakanishi, T., und Sekimizu, K. (2007). Stimulation of RNA polymerase II transcript cleavage activity contributes to maintain transcriptional fidelity in yeast. *Genes Cells* 12, 547-559.
- Kuehner, J. N., und Brow, D. A. (2006). Quantitative analysis of in vivo initiator selection by yeast RNA polymerase II supports a scanning model. *J Biol Chem* 281, 14119-14128.

- Kuhn, C. D., Geiger, S. R., Baumli, S., Gartmann, M., Gerber, J., Jennebach, S., Mielke, T., Tschochner, H., Beckmann, R., und Cramer, P. (2007). Functional architecture of RNA polymerase I. *Cell* 131, 1260-1272.
- Kusser, A. G., Bertero, M. G., Naji, S., Becker, T., Thomm, M., Beckmann, R., und Cramer, P. (2008). Structure of an archaeal RNA polymerase. *J Mol Biol* 376, 303-307.
- Kuznedelov, K., Korzheva, N., Mustaev, A., und Severinov, K. (2002). Structure-based analysis of RNA polymerase function: the largest subunit's rudder contributes critically to elongation complex stability and is not involved in the maintenance of RNA-DNA hybrid length. *Embo J* 21, 1369-1378.
- Kwapisz, M., Beckouet, F., und Thuriaux, P. (2008). Early evolution of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Trends Genet* 24, 211-215.
- Kyrpides, N. C., und Ouzounis, C. A. (1999). Transcription in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8545-8550.
- Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D., und Ebright, R. H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 12, 34-44.
- Landick, R. (2004). Active-site dynamics in RNA polymerases. *Cell* 116, 351-353.
- Lane, W. J., und Darst, S. A. (2010). Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: structural analysis. *J Mol Biol* 395, 686-704.
- Lange, U., und Hausner, W. (2004). Transcriptional fidelity and proofreading in Archaea and implications for the mechanism of TFS-induced RNA cleavage. *Mol Microbiol* 52, 1133-1143.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., und Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5768-5772.
- Lawson, C. L., Swigon, D., Murakami, K. S., Darst, S. A., Berman, H. M., und Ebright, R. H. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* 14, 10-20.
- Li, Y., Flanagan, P. M., Tschochner, H., und Kornberg, R. D. (1994). RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263, 805-807.
- Littlefield, O., Korkhin, Y., und Sigler, P. B. (1999). The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13668-13673.

- Lu, Q., Han, J., Zhou, L., Coker, J. A., DasSarma, P., DasSarma, S., und Xiang, H. (2008). Dissection of the regulatory mechanism of a heat-shock responsive promoter in *Haloarchaea*: a new paradigm for general transcription factor directed archaeal gene regulation. *Nucleic Acids Res* 36, 3031-3042.
- Magill, C. P., Jackson, S. P., und Bell, S. D. (2001). Identification of a conserved archaeal RNA polymerase subunit contacted by the basal transcription factor TFB. *J Biol Chem* 276, 46693-46696.
- Malik, S., Lee, D. K., und Roeder, R. G. (1993). Potential RNA polymerase II-induced interactions of transcription factor TFIIB. *Mol Cell Biol* 13, 6253-6259.
- Marr, M. T., und Roberts, J. W. (1997). Promoter recognition as measured by binding of polymerase to nontemplate strand oligonucleotide. *Science* 276, 1258-1260.
- Meinhart, A., Blobel, J., und Cramer, P. (2003). An extended winged helix domain in general transcription factor E/II α . *J Biol Chem* 278, 48267-48274.
- Meka, H., Daoust, G., Arnvig, K. B., Werner, F., Brick, P., und Onesti, S. (2003). Structural and functional homology between the RNAP(I) subunits A14/A43 and the archaeal RNAP subunits E/F. *Nucleic Acids Res* 31, 4391-4400.
- Mekler, V., Kortkhonja, E., Mukhopadhyay, J., Knight, J., Revyakin, A., Kapanidis, A. N., Niu, W., Ebright, Y. W., Levy, R., und Ebright, R. H. (2002). Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell* 108, 599-614.
- Micorescu, M., Grünberg, S., Franke, A., Cramer, P., Thomm, M., und Bartlett, M. (2008). Archaeal transcription: function of an alternative transcription factor B from *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* 190, 157-167.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., und Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 892-897.
- Mooney, R. A., Darst, S. A., und Landick, R. (2005). Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol Cell* 20, 335-345.
- Morin, P. E., Awrey, D. E., Edwards, A. M., und Arrowsmith, C. H. (1996). Elongation factor TFIIS contains three structural domains: solution structure of domain II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10604-10608.
- Murakami, K. S., und Darst, S. A. (2003). Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr Opin Struct Biol* 13, 31-39.

- Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O., und Darst, S. A. (2002a). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* 296, 1285-1290.
- Murakami, K. S., Masuda, S., und Darst, S. A. (2002b). Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296, 1280-1284.
- Murakami, K. S., Masuda, S., und Darst, S. A. (2003). Crystallographic analysis of *Thermus aquaticus* RNA polymerase holoenzyme and a holoenzyme/promoter DNA complex. *Methods Enzymol* 370, 42-53.
- Naji, S., Bertero, M. G., Spitalny, P., Cramer, P., und Thomm, M. (2008). Structure-function analysis of the RNA polymerase cleft loops elucidates initial transcription, DNA unwinding and RNA displacement. *Nucleic Acids Res* 36, 676-687.
- Naji, S., Grünberg, S., und Thomm, M. (2007). The RPB7 orthologue E' is required for transcriptional activity of a reconstituted archaeal core enzyme at low temperatures and stimulates open complex formation. *J Biol Chem* 282, 11047-11057.
- Naryshkin, N., Revyakin, A., Kim, Y., Mekler, V., und Ebright, R. H. (2000). Structural organization of the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell* 101, 601-611.
- Nesser, N. K., Peterson, D. O., und Hawley, D. K. (2006). RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3268-3273.
- Nickels, B. E. (2009). Genetic assays to define and characterize protein-protein interactions involved in gene regulation. *Methods* 47, 53-62.
- Nikolov, D. B., Chen, H., Halay, E. D., Usheva, A. A., Hisatake, K., Lee, D. K., Roeder, R. G., und Burley, S. K. (1995). Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377, 119-128.
- Nikolov, D. B., Hu, S. H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N. H., Roeder, R. G., und Burley, S. K. (1992). Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* 360, 40-46.
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., und Goldfarb, A. (1997). The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* 89, 33-41.
- Olmsted, V. K., Awrey, D. E., Koth, C., Shan, X., Morin, P. E., Kazanis, S., Edwards, A. M., und Arrowsmith, C. H. (1998). Yeast transcript elongation factor (TFIIS), structure and function. I: NMR structural analysis of the minimal transcriptionally active region. *J Biol Chem* 273, 22589-22594.

- Opalka, N., Chlenov, M., Chacon, P., Rice, W. J., Wriggers, W., und Darst, S. A. (2003). Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. *Cell* 114, 335-345.
- Orlicky, S. M., Tran, P. T., Sayre, M. H., und Edwards, A. M. (2001). Dissociable Rpb4-Rpb7 subassembly of rna polymerase II binds to single-strand nucleic acid and mediates a post-recruitment step in transcription initiation. *J Biol Chem* 276, 10097-10102.
- Ouhammouch, M., Werner, F., Weinzierl, R. O., und Geiduschek, E. P. (2004). A fully recombinant system for activator-dependent archaeal transcription. *J Biol Chem* 279, 51719-51721.
- Ouzounis, C., und Sander, C. (1992). TFIIB, an evolutionary link between the transcription machineries of archaebacteria and eukaryotes. *Cell* 71, 189-190.
- Pardee, T. S., Bangur, C. S., und Ponticelli, A. S. (1998). The N-terminal region of yeast TFIIB contains two adjacent functional domains involved in stable RNA polymerase II binding and transcription start site selection. *J Biol Chem* 273, 17859-17864.
- Paytubi, S., und White, M. F. (2009). The crenarchaeal DNA damage-inducible transcription factor B paralogue TFB3 is a general activator of transcription. *Mol Microbiol* 72, 1487-1499.
- Peyroche, G., Levillain, E., Siaut, M., Callebaut, I., Schultz, P., Sentenac, A., Riva, M., und Carles, C. (2002). The A14-A43 heterodimer subunit in yeast RNA pol I and their relationship to Rpb4-Rpb7 pol II subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14670-14675.
- Pikaard, C. S., Haag, J. R., Ream, T., und Wierzbicki, A. T. (2008). Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci* 13, 390-397.
- Pinto, I., Ware, D. E., und Hampsey, M. (1992). The yeast SUA7 gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo. *Cell* 68, 977-988.
- Pinto, I., Wu, W. H., Na, J. G., und Hampsey, M. (1994). Characterization of sua7 mutations defines a domain of TFIIB involved in transcription start site selection in yeast. *J Biol Chem* 269, 30569-30573.
- Polyakov, A., Richter, C., Malhotra, A., Koulich, D., Borukhov, S., und Darst, S. A. (1998). Visualization of the binding site for the transcript cleavage factor GreB on Escherichia coli RNA polymerase. *J Mol Biol* 281, 465-473.
- Prather, D. M., Larschan, E., und Winston, F. (2005). Evidence that the elongation factor TFIIS plays a role in transcription initiation at GAL1 in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* 25, 2650-2659.

- Puhler, G., Leffers, H., Gropp, F., Palm, P., Klenk, H. P., Lottspeich, F., Garrett, R. A., und Zillig, W. (1989). Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4569-4573.
- Qureshi, S. A., Baumann, P., Rowlands, T., Khoo, B., und Jackson, S. P. (1995). Cloning and functional analysis of the TATA binding protein from *Sulfolobus shibatae*. *Nucleic Acids Res* 23, 1775-1781.
- Qureshi, S. A., und Jackson, S. P. (1998). Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol Cell* 1, 389-400.
- Ranish, J. A., Yudkovsky, N., und Hahn, S. (1999). Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev* 13, 49-63.
- Ream, T. S., Haag, J. R., Wierzbicki, A. T., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Zhu, J. K., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Pasa-Tolic, L., und Pikaard, C. S. (2009). Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell* 33, 192-203.
- Reeder, T. C., und Hawley, D. K. (1996). Promoter proximal sequences modulate RNA polymerase II elongation by a novel mechanism. *Cell* 87, 767-777.
- Reiter, W. D., Palm, P., und Zillig, W. (1988). Analysis of transcription in the archaeobacterium *Sulfolobus* indicates that archaeobacterial promoters are homologous to eukaryotic pol II promoters. *Nucleic Acids Res* 16, 1-19.
- Robb, F. T., Maeder, D. L., Brown, J. R., DiRuggiero, J., Stump, M. D., Yeh, R. K., Weiss, R. B., und Dunn, D. M. (2001). Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods Enzymol* 330, 134-157.
- Robert, F., Forget, D., Li, J., Greenblatt, J., und Coulombe, B. (1996). Localization of subunits of transcription factors IIE and IIF immediately upstream of the transcriptional initiation site of the adenovirus major late promoter. *J Biol Chem* 271, 8517-8520.
- Sakurai, H., Mitsuzawa, H., Kimura, M., und Ishihama, A. (1999). The Rpb4 subunit of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* RNA polymerase II is essential for cell viability and similar in structure to the corresponding subunits of higher eukaryotes. *Mol Cell Biol* 19, 7511-7518.
- Sampath, V., und Sadhale, P. (2005). Rpb4 and Rpb7: a sub-complex integral to multi-subunit RNA polymerases performs a multitude of functions. *IUBMB Life* 57, 93-102.
- Santangelo, T. J., Cubonova, L., James, C. L., und Reeve, J. N. (2007). TFB1 or TFB2 is sufficient for *Thermococcus kodakaraensis* viability and for basal transcription in vitro. *J Mol Biol* 367, 344-357.

- Schnapp, G., Graveley, B. R., und Grummt, I. (1996). TFIIS binds to mouse RNA polymerase I and stimulates transcript elongation and hydrolytic cleavage of nascent rRNA. *Mol Gen Genet* 252, 412-419.
- Severinov, K., Fenyo, D., Severinova, E., Mustaev, A., Chait, B. T., Goldfarb, A., und Darst, S. A. (1994). The sigma subunit conserved region 3 is part of "5'-face" of active center of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem* 269, 20826-20828.
- Sharp, M. M., Chan, C. L., Lu, C. Z., Marr, M. T., Nechaev, S., Merritt, E. W., Severinov, K., Roberts, J. W., und Gross, C. A. (1999). The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. *Genes Dev* 13, 3015-3026.
- Shockley, K. R., Ward, D. E., Chhabra, S. R., Connors, S. B., Montero, C. I., und Kelly, R. M. (2003). Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* 69, 2365-2371.
- Siaut, M., Zaros, C., Levivier, E., Ferri, M. L., Court, M., Werner, M., Callebaut, I., Thuriaux, P., Sentenac, A., und Conesa, C. (2003). An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Mol Cell Biol* 23, 195-205.
- Sikorski, R. S., und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Smale, S. T., und Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-479.
- Sousa, R. (2005). Machinations of a maxwellian demon. *Cell* 120, 155-156.
- Spitalny, P., und Thomm, M. (2003). Analysis of the open region and of DNA-protein contacts of archaeal RNA polymerase transcription complexes during transition from initiation to elongation. *J Biol Chem* 278, 30497-30505.
- Spitalny, P., und Thomm, M. (2009). Exonuclease III footprinting on immobilized DNA templates. *Methods Mol Biol* 543, 49-56.
- Steitz, T. A. (2009). The structural changes of T7 RNA polymerase from transcription initiation to elongation. *Curr Opin Struct Biol* 19, 683-690.
- Sun, Z. W., Tessmer, A., und Hampsey, M. (1996). Functional interaction between TFIIB and the Rpb9 (Ssu73) subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 24, 2560-2566.
- Sweetser, D., Nonet, M., und Young, R. A. (1987). Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1192-1196.

- Sydow, J. F., Brueckner, F., Cheung, A. C., Damsma, G. E., Dengl, S., Lehmann, E., Vassylyev, D., und Cramer, P. (2009). Structural basis of transcription: mismatch-specific fidelity mechanisms and paused RNA polymerase II with frayed RNA. *Mol Cell* 34, 710-721.
- Sydow, J. F., und Cramer, P. (2009). RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Curr Opin Struct Biol* 19, 732-739.
- Tan, L., Wiesler, S., Trzaska, D., Carney, H. C., und Weinzierl, R. O. (2008). Bridge helix and trigger loop perturbations generate superactive RNA polymerases. *J Biol* 7, 40.
- Tan, Q., Prysak, M. H., und Woychik, N. A. (2003). Loss of the Rpb4/Rpb7 subcomplex in a mutant form of the Rpb6 subunit shared by RNA polymerases I, II, and III. *Mol Cell Biol* 23, 3329-3338.
- Thomas, E., Pingoud, A., und Friedhoff, P. (2002). An efficient method for the preparation of long heteroduplex DNA as substrate for mismatch repair by the Escherichia coli MthLS system. *Biol Chem* 383, 1459-1462.
- Thomm, M., und Wich, G. (1988). An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 16, 151-163.
- Touloukhonov, I., Zhang, J., Palangat, M., und Landick, R. (2007). A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing. *Mol Cell* 27, 406-419.
- Tsai, F. T., und Sigler, P. B. (2000). Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *Embo J* 19, 25-36.
- Tuske, S., Sarafianos, S. G., Wang, X., Hudson, B., Sineva, E., Mukhopadhyay, J., Birktoft, J. J., Leroy, O., Ismail, S., Clark, A. D., Jr., *et al.* (2005). Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straight-bridge-helix active-center conformation. *Cell* 122, 541-552.
- Vassylyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M. N., Borukhov, S., und Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417, 712-719.
- Vassylyev, D. G., Vassylyeva, M. N., Perederina, A., Tahirov, T. H., und Artsimovitch, I. (2007a). Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature* 448, 157-162.
- Vassylyev, D. G., Vassylyeva, M. N., Zhang, J., Palangat, M., Artsimovitch, I., und Landick, R. (2007b). Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. *Nature* 448, 163-168.

- Verma-Gaur, J., Rao, S. N., Taya, T., und Sadhale, P. (2008). Genomewide recruitment analysis of Rpb4, a subunit of polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*, reveals its involvement in transcription elongation. *Eukaryot Cell* 7, 1009-1018.
- Waage, I., Schmid, G., Thumann, S., Thomm, M., und Hausner, W. (2010). A Shuttle Vector Based Transformation System for *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol*. PMID: 20363792
- Wang, D., Bushnell, D. A., Huang, X., Westover, K. D., Levitt, M., und Kornberg, R. D. (2009). Structural basis of transcription: backtracked RNA polymerase II at 3.4 angstrom resolution. *Science* 324, 1203-1206.
- Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., und Kornberg, R. D. (2006). Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell* 127, 941-954.
- Werner, F. (2007). Structure and function of archaeal RNA polymerases. *Mol Microbiol* 65, 1395-1404.
- Werner, F. (2008). Structural evolution of multisubunit RNA polymerases. *Trends Microbiol* 16, 247-250.
- Werner, F., und Weinzierl, R. O. (2002). A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol Cell* 10, 635-646.
- Werner, F., und Weinzierl, R. O. (2005). Direct modulation of RNA polymerase core functions by basal transcription factors. *Mol Cell Biol* 25, 8344-8355.
- Westover, K. D., Bushnell, D. A., und Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell* 119, 481-489.
- Wierzbicki, A. T., Haag, J. R., und Pikaard, C. S. (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 135, 635-648.
- Wind, M., und Reines, D. (2000). Transcription elongation factor SII. *Bioessays* 22, 327-336.
- Woese, C. R., und Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., und Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4576-4579.
- Wooddell, C. I., und Burgess, R. R. (2000). Topology of yeast RNA polymerase II subunits in transcription elongation complexes studied by photoaffinity cross-linking. *Biochemistry* 39, 13405-13421.

- Woychik, N. A., und Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108, 453-463.
- Yamaguchi, Y., Mura, T., Chanarat, S., Okamoto, S., und Handa, H. (2007). Hepatitis delta antigen binds to the clamp of RNA polymerase II and affects transcriptional fidelity. *Genes Cells* 12, 863-875.
- Young, B. A., Anthony, L. C., Gruber, T. M., Arthur, T. M., Heyduk, E., Lu, C. Z., Sharp, M. M., Heyduk, T., Burgess, R. R., und Gross, C. A. (2001). A coiled-coil from the RNA polymerase beta' subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by sigma(70). *Cell* 105, 935-944.
- Young, B. A., Gruber, T. M., und Gross, C. A. (2004). Minimal machinery of RNA polymerase holoenzyme sufficient for promoter melting. *Science* 303, 1382-1384.
- Zaychikov, E., Martin, E., Denissova, L., Kozlov, M., Markovtsov, V., Kashlev, M., Heumann, H., Nikiforov, V., Goldfarb, A., und Mustaev, A. (1996). Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center. *Science* 273, 107-109.
- Zhang, D. Y., Carson, D. J., und Ma, J. (2002). The role of TFIIB-RNA polymerase II interaction in start site selection in yeast cells. *Nucleic Acids Res* 30, 3078-3085.
- Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., und Darst, S. A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98, 811-824.
- Zhang, J., Li, E., und Olsen, G. J. (2009). Protein-coding gene promoters in *Methanocaldococcus* (*Methanococcus*) *jannaschii*. *Nucleic Acids Res* 37, 3588-3601.
- Zhang, Z., und Dietrich, F. S. (2005). Mapping of transcription start sites in *Saccharomyces cerevisiae* using 5' SAGE. *Nucleic Acids Res* 33, 2838-2851.
- Zhu, W., Zeng, Q., Colangelo, C. M., Lewis, M., Summers, M. F., und Scott, R. A. (1996). The N-terminal domain of TFIIB from *Pyrococcus furiosus* forms a zinc ribbon. *Nat Struct Biol* 3, 122-124.
- Ziegler, L. M., Khapersky, D. A., Ammerman, M. L., und Ponticelli, A. S. (2003). Yeast RNA polymerase II lacking the Rpb9 subunit is impaired for interaction with transcription factor IIF. *J Biol Chem* 278, 48950-48956.

IX) Anhang

1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
APB	Azidophenacyl Bromid
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BLAST	Basic Local Alignment Tool
Bq	Bequerelle
BRE	<i>B recognition element</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
Cryo-EM	Cryo-Elektronenmikroskopie
CTD	C-terminale Domäne
CV	Column Volume(s) (Säulenvolumen)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Elongationskomplex
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
et al.	et alii
5-FOA	5-Fluoruracil-4-carbonsäure
gdh	Glutamatdehydrogenase
griech.	griechisch
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch
LB	Luria Bertani
min	Minute(n)
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
MWCO	Molecular weight cut off (Molekulargewichts-Ausschlussgröße)
NiNTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PDB	<i>Protein Data Base</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIC	Präinitiationskomplex
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PNK	Polynukleotidkinase
Pol I, -II, -III	RNA-Polymerase I, -II, -III
dIC	Poly (2'Deoxyinosin-2'Deoxytyridyl Säure)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	<i>rotation per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylphosphat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
smFRET	<i>single-molecule fluorescence resonance energy transfer</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFB(1 oder 2)	Transkriptionsfaktor B (1 oder 2), archaeell,
TFIIB	Transkriptionsfaktor IIB, eukaryotisch
TF(II)B	Transkriptionsfaktor B und - IIB
TFE	Transkriptionsfaktor E, archaeell
TFIIE	Transkriptionsfaktor IIE, eukaryotisch
TFS	Transkriptionsfaktor S, archaeell
TFIIS	Transkriptionsfaktor IIS, eukaryotisch
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s), Einheit der enzymatischen Aktivität
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WH	<i>winged-helix</i>
WT	Wildtyp
YPD	Hefeextrakt Pepton Dextrose, Hefe-Vollmedium
z.B.	zum Beispiel
Zn-Ribbon	<i>Zinc-Ribbon</i>

Buchstabencodes der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
K	Lys	Lysin	V	Val	Valin
L	Leu	Leucin	I	Ile	Isoleucin
W	Trp	Tryptophan	Y	Tyr	Tyrosin

Buchstabencodes der Nukleinsäurebasen

A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil

2. Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn **Prof. Dr. Michael Thomm** für die Vergabe dieses spannenden Themas und die engagierte Betreuung dieser Doktorarbeit. Sein beständiges Interesse und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ganz besonders möchte ich mich für die Ermöglichung meines Aufenthalts am Genzentrum München bedanken.

Die enge Kollaboration mit Herrn **Prof. Dr. Patrick Cramer** hat diese Arbeit erst möglich gemacht. Ich danke ihm und der gesamten Arbeitsgruppe am Genzentrum für die nette Zeit und das konstruktive Arbeitsklima, ganz besonders jedoch **Martin Seizl** und **Kerstin Meier**, die mich mit den *in vivo* und *in vitro* Experimenten im Hefesystem vertraut gemacht haben und dabei unterstützten. Der begeisterte fachliche Austausch hat mich sehr motiviert und inspiriert.

Ich bedanke mich bei **Wolfgang Forster** für die Unterstützung bei der Aufreinigung von TFB und für die immer sehr geduldige technische Hilfe an der ÄKTA. Außerdem möchte ich meinen Praktikantinnen **Pauline Decard** und **Fabienne Hirchaud** danken, die fleißig und interessiert zur Reinigung von RNAP Untereinheiten beigetragen haben.

Zusammenfassend möchte ich mich bei **allen Kollegen des Lehrstuhls** für die außergewöhnlich angenehme Atmosphäre bedanken. Mit vielen führte ich im Laufe der Doktorarbeit anregende wissenschaftliche Gespräche - insbesondere möchte ich hier Herrn **PD Dr. Winfried Hausner** dankend erwähnen, der sich stets mit viel Enthusiasmus jeder experimentellen oder organisatorischen Fragestellung widmet.

Zu guter Letzt danke ich meinen **Freunden** und meiner **Familie**, deren Dasein mir viel Energie und Zuversicht geschenkt hat. Besonders meine Mutter **Angela Zeller** und meiner Großmutter **Angela Aschauer** danke ich für die moralische und finanzielle Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

3. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Grünberg, S., Reich, C., Zeller, M. E., Bartlett, M. S., und Thomm, M. (2010). Rearrangement of the RNA polymerase subunit H and the lower jaw in archaeal elongation complexes. *Nucleic Acids Res* 38, 1950-1963.

Kostrewa, D., Zeller, M. E., Armache, K. J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., und Cramer, P. (2009). RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* 462, 323-330.

Regensburg, im Mai 2010